

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin - Schwerpunkt Nephrologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Hoyer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**CHARAKTERISIERUNG UND VALIDIERUNG EINER
NEUARTIGEN MAKROPHAGENSPEZIFISCHEN TRAP-
MAUSLINIE (Mac^{TRAP}) FÜR DIE ANALYSE VON
TRANSLATOMSIGNATUREN RENALER MAKROPHAGEN**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Maximilian Claudius Thomaßen aus Düsseldorf

Marburg 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
28.06.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Ivica Grgic

Korreferent: Prof. Dr. Alexander Visekruna

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Physiologische Bedeutung der Niere.....	1
1.2 Akute Nierenschädigung, chronische Nierenerkrankung: Epidemiologie.....	1
1.3 CKD, Nierenfibrose und die Rolle von Makrophagen	4
1.3.1 Anatomie der Niere	4
1.3.2 Folgen von intrarenalen Schädigungen	5
1.3.3 Allgemeiner Ablauf der Nierenfibrose	6
1.3.4 Allgemeine Einteilung von Makrophagen.....	8
1.3.5 Die Bedeutung von Makrophagen bei chronischer Inflammation, Wundheilung und Fibrosierung in der Niere.....	11
1.4 Polysomen und TRAP (Translational Ribosome Affinity Purification)	15
1.4.1 mRNA.....	15
1.4.2 Ribosomen und Polysomen.....	16
1.4.3 TRAP-Methodik	16
1.5 Eigenschaften von c-fms/CSF-1R	19
1.6 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien / Zubehör	22
2.1.3 Chemikalien	23
2.1.4 Antikörper und Sekundärreagenzien	24
2.1.5 Standards	25
2.1.6 Kit-Systeme	25
2.1.7 Puffer und Lösungen	26
2.2 Versuchstiere.....	27
2.2.1 Generierung der transgenen Mac ^{TRAP} -Maus.....	27
2.2.2 Tierhaltung.....	28

2.2.3 Biometrische Analysen	29
2.2.4 Genotypisierung der transgenen Mäuse.....	29
2.3 Unilaterale Ureter-Obstruktion (UUO): Induktion einer Nierenfibrose	31
2.4 Molekularbiologische Analysen	32
2.4.1 mRNA-Isolation	32
2.4.2 cDNA-Synthese	34
2.4.3 Cycle-gradient PCR und quantitative real-time-RT-PCR.....	35
2.5 Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot.....	39
2.6 Immunfluoreszenzfärbung	40
3 Ergebnisse	43
3.1 Biometrische Analysen	43
3.1.1 Wachstumsbeobachtung.....	43
3.1.2 Organgrößenvergleich und makroskopische Untersuchung	45
3.2 Molekularbiologische Analysen	47
3.2.1 Qualitativer Nachweis der Transgenexpression und -induzierbarkeit	47
3.2.2 Quantitativer Nachweis der Transgenexpression und -induzierbarkeit	48
3.3 Nachweis auf Proteinebene	49
3.4 Immunfluoreszenzfärbung	50
4 Diskussion und Ausblick	57
4.1 Biometrische Analysen	58
4.1.1 Wachstumsbeobachtung.....	58
4.1.2 Organgrößenvergleich und makroskopische Untersuchung	58
4.2 Molekularbiologische und biochemische Analysen zur Untersuchung der Expression und Induzierbarkeit des cfms-eGFP-L10a-Transgens in vivo.....	60
4.3 Immunhistologie und fluoreszenzmikroskopische Analysen von Mac^{TRAP}- Nierengewebe.....	60
4.4 Limitationen und Ausblick.....	62
5 Zusammenfassung.....	64
6 Summary.....	65
7 Literaturverzeichnis	67
8 Anhang.....	74
8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen.....	74
8.2 Danksagung.....	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Illustration der TRAP-Methode.....	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids	28
Abbildung 3: Beispiel einer positiven Genotypisierung.....	31
Abbildung 4: Schema der RNA-Isolation	33
Abbildung 5: SYBR Green-Bindung in einer real-time PCR.....	37
Abbildung 6: Wachstumsverlauf der Mac ^{TRAP} -Linie	43
Abbildung 7: Wachstumskurve der DBA/2J-Linie	44
Abbildung 8: Wachstumskurve der C57BL/6J-Linie.....	44
Abbildung 9: Vergleich von Mittelwert und Standardabweichung des Gewichts verschiedener Organe von Wildtyp (WT) und Mac ^{TRAP} -Mäusen	45
Abbildung 10: Organschau eines Wildtyp-Tiers (jeweils links) und eines für das Transgen positiven Mac ^{TRAP} -Tiers (jeweils rechts)	46
Abbildung 11: Cycle-gradient PCR, Gegenüberstellung von UUO (links) und CLK (rechts).....	47
Abbildung 12: Veränderung der Genexpression von Fibrosemarkern, F4/80 und eGFP- L10a nach 7 d UUO (schwarze Balken) im Vergleich zur CLK-Kontrolle (weiße Balken).....	48
Abbildung 13: Western Blot mit Nachweis einer gesteigerten eGFP-L10a-Expression in Nierenlysaten von Mac ^{TRAP} -Tieren nach 7 d UUO im Vergleich zu CLK-Kontrollen	49
Abbildung 14: EGFP-L10a + F4/80-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe.	51
Abbildung 15: EGFP-L10a + CD3-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe. .	52
Abbildung 16: EGFP-L10a + CD31-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe.	53
Abbildung 17: EGFP-L10a + PDGFR β -Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe.	54
Abbildung 18: EGFP-L10a + α SMA-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe.	55
Abbildung 19: Analyse der Bestätigungsfärbung für F4/80.....	56
Abbildung 20: Analyse der Ausschlussfärbungen.....	56
Abbildung 21: Vergleich von Organgewichten aus Sohal et al., 2009 mit selbst erhobenen Daten gleichaltriger Mac ^{TRAP} -Tiere.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ansatz für die Genotypisierung.....	30
Tabelle 2: Narkosemittel.	31
Tabelle 3 Namen und Sequenzen der für die cycle-gradient- und real-time-PCR verwendeten Primer	35
Tabelle 4: Schema der Zyklus-Gradienten-PCR	36
Tabelle 5: Spezies und Verdünnungen der verwendeten primären Antikörper.....	41

Abkürzungsverzeichnis

AKI / ANV	<i>acute kidney injury</i> / akutes Nierenversagen
ARG1	Arginase-1
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CKD	<i>chronic kidney disease</i> / chronische Nierenerkrankung
CLK	<i>contra lateral kidney</i> / kontralaterale Niere
Col1 α 1	<i>collagen, type I, alpha 1</i>
CSF-1	<i>colony stimulating factor</i>
CSF1-R	<i>colony stimulating factor 1 receptor (= c-fms)</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DAMP	<i>danger / damage associated molecular patterns</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DT	Diphtherie-Toxin
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
hnRNA	heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN γ	Interferon gamma

IGF	Insulin like growth factor
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
I/R	Ischämie / Reperfusion
LCM	<i>laser capture microdissections</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid / messenger-Ribonucleinsäure</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
OCT	<i>optimal cutting temperature</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDGFR β	<i>platelet derived growth factor receptor beta 1</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNase	Ribonuklease
RPGN	rapid-progressive Glomerulonephritis
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
TAE	Tris EDTA Acetat
TBS/T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TGF- β 1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	<i>translational ribosome affinity purification</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
SAP	Serum Amyloid P
UUO	unilaterale ureterale Obstruktion

VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Physiologische Bedeutung der Niere

Die Niere ist eines der am höchsten differenzierten Organe des menschlichen Körpers. Am Ende der Embryonalentwicklung formen nahezu 30 verschiedene Zelltypen die Kompartimente der Niere (Harrison and Longo, 2012). Diese Vielzahl an Zellen ist verantwortlich für die Modulation vielgestaltiger, komplexer physiologischer Prozesse. Zu diesen zählen Entgiftung von körpereigenen und -fremden Substanzen, endokrine Funktionen, an denen die Niere als Effektor wie auch als Zielorgan beteiligt ist, Regulation des Blutdrucks und der intraglomerulären Hämodynamik, Salz- und Wassertransport sowie Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts (Harrison and Longo, 2012). Vor dem Hintergrund der Erfüllung dieser multiplen Funktionen sind die klinischen Folgen einer Nierenfunktionsminderung ebenfalls vielfältig (Battegay, 2012). Verlust von einer oder mehrerer dieser Funktionen kann erhebliche Konsequenzen für Gesundheit und Lebensqualität, Morbidität und Mortalität haben.

1.2 Akute Nierenschädigung, chronische Nierenerkrankung: Epidemiologie

Nierenschäden lassen sich grob in zwei Kategorien einteilen: Akutes Nierenversagen (ANV, englisch: Acute Kidney Injury, AKI) und chronische Nierenerkrankung (englisch: Chronic Kidney Disease, CKD). Die chronische Nierenerkrankung kann schließlich in die terminale Niereninsuffizienz (im Englischen End Stage Renal Disease, ESRD) münden. Diese Bezeichnungen beschreiben die gemeinsame Endstrecke einer ätiologisch heterogenen Gruppe von Krankheiten, die mit gemeinsamen diagnostischen Merkmalen einhergehen, z. B. Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Anstieg von harnpflichtigen Substanzen im Serum.

Das Auftreten von akuten Nierenschädigungen und chronischer Nierenerkrankung ist in der Allgemeinbevölkerung häufig. In den USA beispielsweise ist AKI der Hauptgrund für 5-7 % der akuten Krankenhausaufnahmen sowie für bis zu 30 % der Aufnahmen auf Intensivstationen (Harrison and Longo, 2012). Die Inzidenz der AKI ist in den Vereinigten Staaten seit 1988 um mehr als das Vierfache gestiegen und beläuft sich

mittlerweile jährlich auf geschätzt 500 pro 100.000 Einwohner, höher als die dortige jährliche Inzidenz von Schlaganfällen. Zu den Individuen mit akuter Einschränkung der Nierenfunktion hinzu kommen mindestens 6 % der US-Bevölkerung, die an einer CKD der Stadien 1 oder 2 leiden sowie 4,5 % mit einer CKD Stadium 3 oder 4 (Harrison and Longo, 2012). Die Unterteilung in AKI und CKD ist außerdem nicht statisch zu sehen: anders als lange vermutet häufen sich die Hinweise, dass die Regenerationsprozesse nach AKI nicht immer eine vollständige „restitutio ad integrum“ erreichen: Patienten, die eine AKI überleben, haben auch bei zwischenzeitiger formaler Normalisierung der Nierenfunktion ein wesentlich höheres Risiko, im weiteren Verlauf eine chronische Niereninsuffizienz zu entwickeln (Coca et al., 2012).

Stellt die Niere ihre Funktion fast vollständig ein (gemeinhin verstanden als eine GFR < 15 ml/min), stehen heutzutage verschiedene lebensrettende Nierenersatzverfahren zur Verfügung. Als „Goldstandard“ der Nierenersatztherapie gilt die Transplantation einer Spenderniere mit den Problemen der Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs und langfristiger medikamentöser Immunsuppression sowie der nicht selbstverständlichen Verfügbarkeit eines Spenderorgans (Longmore et al., 2014). Neben der Transplantation gibt es zwei wesentliche Optionen der aktiven Nierenersatztherapie: Bei der Hämodialyse wird das Blut extrakorporal über eine semipermeable Membran geleitet, an der das Dialysat in der entgegengesetzten Richtung vorbeifließt und ein Austausch kleinerer gelöster Stoffe entlang des Konzentrationsgradienten stattfindet (Longmore et al., 2014). Bei der Peritonealdialyse wird das Peritoneum des Patienten als natürliche semipermeable Membran genutzt. Dabei verbleibt die Dialyseflüssigkeit, über einen Katheter eingeleitet, in der Peritonealhöhle, was die langsame Diffusion der Stoffe ins Dialysat erlaubt. Peritonealdialyse ist relativ einfach in der Handhabung, kann zu Hause erfolgen und bietet dem Patienten so mehr Freiraum (Longmore et al., 2014).

Laut der Internetpräsenz der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) sind derzeit in Deutschland etwa 70.000 Patienten dauerhaft dialysepflichtig (<http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/daten-und-fakten-zur-nephrologie.html>, letzter Zugriff am 27.07.2017). Hinzu kommen noch ca. 25.000 Patienten mit einem funktionierenden Nierentransplantat. Die Prävalenz der von einer terminalen Niereninsuffizienz betroffenen Patienten steigt in Deutschland pro Jahr um etwa 3-5 %. Häufigste Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz sind hierzulande Diabetes Mellitus (Typ I und II), Hypertonie, Glomerulonephritiden und interstitielle Nephritiden.

Die Kosten einer dauerhaften Dialysetherapie und die damit verbundene sozioökonomische Belastung sind beträchtlich. Sie belaufen sich je nach Verfahren auf ca. 34.000 bis 44.000 Euro pro Jahr und Patient (<https://www.diabsite.de/aktuelles/nachrichten/2004/040930d.html>, letzter Zugriff am 27.07.2017).

Die jährliche Mortalität an Dialyse beträgt 20 %. Die Vier-Jahres-Überlebensrate für Dialysepatienten, statistisch bereinigt für Geschlecht, Alter und Diabetes mellitus, beträgt nur 65 %. Eine katabole Stoffwechsellage an Hämodialyse ist nicht nur häufig, sondern auch mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert: Ein sich entwickelnder sekundärer Hyperparathyreoidismus führt zu hohem Knochenumbau und renaler Osteodystrophie. Die zunehmende Urämie kann die Funktion der Granulozyten und Thrombozyten negativ beeinflussen: Die sepsisassoziierte Mortalität ist bei Dialysepatienten 100-300x höher als in der Gesamtbevölkerung. Weiterhin ist auch die Rate maligner Erkrankungen bei Dialysepatienten deutlich höher als bei Nicht-Dialysepatienten (Longmore et al., 2014). Aus prognostischer Sicht stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die wichtigste Komplikation bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz dar (Weidtmann and Schunkert, 2007). Myokardinfarkte und zerebrovaskuläre Ereignisse sind wesentlich häufiger bei Dialysepatienten, vermutlich durch eine Kombination aus Hypertonus und Calcium/Phosphat-Dysregulation (Longmore et al., 2014). Welche Komplikationen Folge der Niereninsuffizienz und/oder welche Folge des Dialyseverfahrens sind, ist dabei schwer zu trennen.

Sowohl aus klinischer als auch volkswirtschaftlicher Sicht ist eine weitere Aufklärung der noch unzureichend verstandenen pathophysiologischen Mechanismen, die zu chronischer Niereninsuffizienz und terminalem Nierenversagen führen, von hoher Relevanz.

1.3 CKD, Nierenfibrose und die Rolle von Makrophagen

1.3.1 Anatomie der Niere

Die Niere kann makroskopisch in die außen liegende Nierenrinde und das nach innen zum Hilus gerichtete Nierenmark unterteilt werden. Das Nierenmark bildet dabei die Markpyramiden, deren Basis nach außen und deren Spitze (sog. Papillen) nach innen zum Hilus zeigt. Diese Papillen münden in die Nierenkelche, welche sich wiederum zum Nierenbecken zusammenschließen, aus dem als Beginn der ableitenden Harnwege der Harnleiter (Ureter) entspringt. Der Nierenhilus ist zudem Eintritts- bzw. Austrittsort der Arteria renalis und Vena renalis, welche die Nieren an den Blutkreislauf anschließen.

Die funktionelle Einheit der menschlichen Niere ist das Nephron. Es setzt sich aus dem Nierenkörperchen und den Nierentubuli zusammen. Das Nierenkörperchen besteht aus der Bowman-Kapsel mit innerem und äußerem Blatt, dem Glomerulum, welches ein Blutkapillarknäuel mit einem zu- und einem abführenden Blutgefäß (Vas afferens bzw. efferens) ist, das sich in die Kapsel einstülpt, und dem Mesangium sowie den Podozyten. Der Nierentubulus wird unterteilt in den proximalen Tubulus mit Pars convoluta und Pars recta, den intermediären Tubulus mit Pars descendens (Henle-Schleife) und Pars ascendens, den distalen Tubulus mit Pars recta und Pars convoluta sowie den Verbindungstubulus, auf den dann das Sammelrohr folgt. Die Glomerula liegen in der Nierenrinde, Sammelrohre und gestreckt verlaufende Tubuli bilden das Nierenmark. In den Nierenkörperchen erfolgt die Ultrafiltration des Blutes, wobei sich das Ultrafiltrat, welches dem Primärharn entspricht, im Bowman'schen Raum auf der viszeralen Seite sammelt und in den proximalen Tubulusabschnitt abgeleitet wird. Der Primärharn wird dann durch Rückresorptions- und Sekretionsprozesse innerhalb des Tubulusapparats weiter modifiziert. Eine wichtige Aufgabe bei der Ultrafiltration übernehmen die Podozyten, speziell differenzierte Epithelzellen des inneren Blattes der Bowman-Kapsel, die mit ihren feinen Fußfortsätzen die Glomerulumkapillaren umgreifen. Diese Fußfortsätze mit der dazwischen gespannten Schlitzmembran bilden mit der doppelten Basallamina und dem glomerulären Kapillarendothel die Blut-Harn-Schranke, auch glomeruläre Filtrationsbarriere genannt. Den Raum zwischen den Glomerulumkapillaren nimmt das Mesangium ein, welches sich aus spezialisierten Mesangialzellen und Matrix konstituiert. Letztere enthält Mikrofibrillen, Collagen IV, V, VI, Proteoglykane und Fibronectin. Das Mesangium hilft den dünnen Kapillarwänden des Glomerulums, dem

hohen intrakapillären Druck standzuhalten. Mesangialzellen sind kontraktile und können durch Variation ihres Kontraktionszustands den Blutfluss durch die glomerulären Kapillaren modifizieren. Den Raum zwischen Nierentubuli und Sammelrohren nimmt das renale Tubulointerstitium ein, ein spezialisiertes Bindegewebe mit Perizyten und perivaskulären Fibroblasten, relativ wenigen Collagenfibrillen und einer wasserreichen Proteoglykanmatrix. Das Interstitium hilft hier nicht nur dabei, die Kohärenz und Integrität des Nierengewebes zu erhalten, sondern ist auch für weitere Funktionen verantwortlich, wie zum Beispiel die Bildung von Erythropoetin in speziellen peritubulären Fibroblasten (Welsch and Sobotta, 2006).

1.3.2 Folgen von intrarenalen Schädigungen

Eine Maus besitzt im Durchschnitt zwischen 12.000 und 16.000 Nephrone pro Niere, die Zahl variiert abhängig von der Mauslinie (Short et al., 2014). Die Anzahl der Nephrone beim Menschen erscheint sogar noch variabler. Der Mensch hat zwischen 225.000 und 900.000 Nephrone pro Niere (Harrison and Longo, 2012). Andere Quellen suggerieren einen möglichen zehnfachen Unterschied in der Anzahl der Nephrone mit einem Durchschnitt von 1.000.000 Nephrone pro Niere (Bertram et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass diese Gesamtzahl, als Reserve verstanden, bestimmt, wie gut eine Adaptation an Funktionsverluste möglich ist: auf Nephronverluste reagiert die restliche Zahl von Nephronen mit einer Hyperfiltration. Dies funktioniert aber nur bis zu einem gewissen Punkt. Ist die kritische Zahl an Nephronen erreicht, setzt ein maladaptiver Prozess ein, der auch die verbleibenden Nephrone langfristig schädigt (Harrison and Longo, 2012). Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, welche eine niedrige Anzahl an Nephronen mit einem höheren Risiko für Nierenerkrankungen assoziieren, während eine höhere Nephronzahl beispielsweise Mäuse vor Salz-induzierter Hypertonie schützte (Bertram et al., 2011; Walker et al., 2012).

Unabhängig von der Art des Auslösers der Nierenschädigung und der daraus resultierenden chronischen Nierenerkrankung führt diese zu einem fortschreitenden, irreversiblen Verlust funktionierender Nierenparenchyms. Histopathologisch lässt sich chronische Nierenerkrankung (CKD) durch Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie, Rarefizierung peritubulärer Kapillaren und chronische Inflammation charakterisieren. Selbst wenn der Auslöser ausgeschaltet oder erfolgreich behandelt

wurde, heilt die CKD in der Regel nicht aus, sondern schreitet häufig voran (Campanholle et al., 2013).

Nierenfibrose wird als maladaptiver Reparaturprozess verstanden, wobei ein Hauptmerkmal die chronische Entzündung ist. Diese stellt einen persistierenden Reiz für die Generierung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und proteolytischen Enzymen sowie die Rekrutierung von Myofibroblasten dar, die als Effektorzellen hauptverantwortlich für die Produktion und Deposition von extrazellulärer Matrix (ECM) sind (Grgic et al., 2012).

Der Reparaturprozess kann in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase ist charakterisiert durch den Versuch des Organismus, verletzte oder apoptotische Zellen durch gesunde desselben Zelltyps zu ersetzen; idealerweise würde dieser Prozess zur vollständigen Ausheilung des Nierenparenchyms führen (*restitutio ad integrum*). Abhängig von Schwere, Dauer und Art der Verletzung folgt auf diese initial vorteilhafte Reaktion die Phase der Fibroplasie bzw. Fibrose, in der funktionierendes Gewebe remodeliert und durch Bindegewebe ersetzt wird. Diese übermäßige Narbenbildung zerstört die normale Architektur des Nierengewebes und kann so zu einem zumeist irreversiblen Verlust von funktionellem Nierenparenchym führen (Grgic et al., 2012).

1.3.3 Allgemeiner Ablauf der Nierenfibrose

Am Beginn der Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose steht die *Induktionsphase*. Hier kommt es unter Einfluss der klassischen proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) zur Infiltration mononukleärer Entzündungszellen, die sich neben residenten interstitiellen Makrophagen vor allem aus den im Blut zirkulierenden und aus peritubulären Kapillaren ins renale Interstitium migrierenden Monozyten rekrutieren (Strutz and Neilson, 2003). Dabei spielt das Tubulusepithel eine wichtige Rolle: Es kann durch apikale Exposition von Proteinen, wie es bei einer Proteinurie z. B. nach Glomerulum-Schaden möglich wäre, zur Produktion diverser proinflammatorischer Faktoren wie Komplementfaktoren, Endothelin-1 und weiterer Chemokine angeregt werden. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten sowie zum Auftreten von Myofibroblasten, die sich von ruhenden Fibroblasten vor allem durch eine de-novo-Expression von alpha-Smooth Muscle Actin (α SMA) unterscheiden (Strutz and Neilson, 2003). Der Ursprung dieser kontraktilen Zellen, die extrazelluläre Matrix produzieren,

wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Es herrscht jedoch weitgehend Einigkeit, dass der größte Teil sich von lokalen stromalen Zellen (residenten Fibroblasten, Perizyten) ableitet. (Grgic et al., 2012). Als weitere mögliche Quellen werden darüber hinaus zirkulierende und schließlich einwandernde Fibrozyten via Differenzierung aus dem Knochenmark, Epithelzellen durch den Wandlungsprozess der Epithel-Mesenchym-Transition (LeBleu et al., 2013) und Endothelzellen durch den Prozess der Endothel-Mesenchym-Transition (Zeisberg et al., 2007) diskutiert.

Es folgt die *inflammatorische Phase*, in der die (Myo-)Fibroblasten durch Zytokine von Entzündungszellen und anderen residenten renalen Zellen stimuliert werden. Zu diesen profibrotischen, die Fibroblastenexpansion und ECM-Produktion fördernden Faktoren gehören vor allem Angiotensin II, Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) und Platelet-derived growth factor (PDGF). TGF- β wird als ein profibrotisches Schlüssel-Zytokin angesehen, wobei nicht alle Effekte direkt auf die zytokine Wirkung zurückzuführen sind, sondern auch mittelbar auf weitere, durch TGF- β beeinflusste Faktoren, wie zum Beispiel die Induktion von Connective tissue growth factor (CTGF) (Strutz and Neilson, 2003).

Die so stimulierten Myofibroblasten produzieren im Tubulointerstitium große Mengen von ECM. Extrazelluläre Matrix erfüllt im gesunden Organ physiologische Aufgaben wie z. B. den Erhalt von Integrität und Stabilität als Teil der Basalmembran in Form von Lamininen, Collagen Typ IV und verschiedenen Proteoglykanen. In fibrotischen Organen sind sowohl die örtliche Anreicherung als auch die Zusammensetzung der ECM erheblich verändert: Am häufigsten vertreten sind hier stark quervernetzte Collagene der Typen I und III, die das normale Gewebe verziehen und in Teilen ersetzen können, sowie Fibronectin, Osteopontin und andere Subtypen von Collagenen und Lamininen. Die abnorme ECM reguliert darüber hinaus die Verfügbarkeit von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Friedman et al., 2013). Ferner deuten neuere Daten darauf hin, dass spezielle Domänen der ECM selbst Signalwirkung haben könnten (Friedman et al., 2013; Strutz and Neilson, 2003).

In der *postinflammatorischen Phase* würde bei regulärer Wundheilung die Resolution des Narbengewebes, vornehmlich durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), erwartet. Bei fibrotischer Entwicklung lässt hier der inflammatorische Prozess bis auf einige wenige Areale stark nach. Die Matrix-Synthese setzt sich jedoch fort. Hierzu bestehen mehrere Vermutungen, wie durch Effekte einer fehlgeleiteten Zell-Zell-Kommunikation und autokrine Regelschleifen die fibrotische Reaktion aufrechterhalten wird (Strutz and Neilson, 2003). Den MMPs kommt hier auch eine wichtige Rolle zu, wobei viele Aspekte

nur unvollständig verstanden sind. Bestimmte MMPs wirken proinflammatorisch, andere wiederum helfen bei der Auflösung von Entzündung und Fibrose. TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) regulieren die MMP-Aktivität über Kontrolle von Produktion, Sekretion der inaktiven Vorstufen, Aktivierung durch Proteolyse, und Degradation (Friedman et al., 2013). Regulatorische Makrophagen können unter bestimmten Voraussetzungen antifibrotische MMPs (z. B. die Subtypen MMP 1,2,8,9 und 13) produzieren und so einen positiven Einfluss auf das Geschehen ausüben (Friedman et al., 2013). Insgesamt ist die Rolle dieser immunmodulatorischen Zellen bei Fibroseprozessen vielfältig. Im nächsten Abschnitt soll daher weiter auf die Eigenschaften von Makrophagen eingegangen werden.

1.3.4 Allgemeine Einteilung von Makrophagen

Um die Vielfalt von Makrophagen fassen zu können, werden sie üblicherweise in zwei große Kategorien eingeteilt: M1/klassisch aktivierte und M2/alternativ aktivierte Makrophagen (Cao et al., 2015).

M1-Makrophagen werden durch Exposition mit Interferon- γ (IFN γ), Lipopolysacchariden (LPS), TNF- α oder GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, MCP1 (macrophage chemoattractant protein 1) stimuliert. Dies rekrutiert wiederum neue Monozyten und T-Zellen und treibt im Allgemeinen die Entzündung voran. IFN γ sorgt außerdem für die Expression der iNOS (inducible nitric oxide synthase), die eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern spielt. Die Rolle der proinflammatorischen M1-Makrophagen in der Abwehr von Infektionen ist gut charakterisiert (Martinez and Gordon, 2014). Aber auch bei der Beseitigung apoptotischer Zellen spielen sie eine Rolle. Endogene Signale von verletzten Wirtszellen, genannt DAMPs (danger/damage-associated molecular patterns), die nach nicht-infektiöser, „steriler“ Verletzung von diesen ausgeschüttet werden, wie zum Beispiel freies ATP oder Nukleinsäuren, werden durch PRRs (pattern recognition receptors) auf Makrophagen erkannt und induzieren über Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor kappa B) eine proinflammatorische Differenzierung (Huen and Cantley, 2015; Lee et al., 2011).

M2-Makrophagen lassen sich weiter subkategorisieren in M2a/mit Wundheilung assoziierte und M2b/immunmodulatorische Makrophagen.

M2a-Makrophagen werden durch ihre typische Reaktion auf IL-4 und IL-13 definiert, die bei ihnen zur Expression von diversen typischen Markern wie dem Mannose Rezeptor (MR) und Arginase-1 (ARG1) führt. Die Folge der Aktivierung mit IL-4/IL-13 ist die Hochregulation von Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth factor (IGF) und Stimulation der Arginase-Aktivität. Arginase sorgt für die Konversion von L-Arginin zu L-Ornithin, welches wiederum zu Prolin, einem Vorläufermolekül des Collagens metabolisiert werden kann. Diese Mechanismen sind relevant für die Wundheilung, aber können bei verlängerter Dauer oder abnormer Hochregulation auch zur Fibroseentwicklung beitragen (Huen and Cantley, 2015; Sica and Mantovani, 2012).

Immunregulatorische M2b-Makrophagen werden typischerweise durch die Einwirkung von Toll-like receptor (TLR) Liganden, Immunkomplexen, Glukokortikoiden, IL-10 und Prostaglandinen induziert. Sie produzieren selbst große Mengen des immunsupprimierenden Zytokins IL-10, weshalb ihnen eine immundämpfende Qualität zugesprochen wird. Die Phagozytose apoptotischer Zellen führt zur Produktion von TGF- β , welches proinflammatorische Zytokine inhibiert, aber auch, wie oben erwähnt, erhebliche profibrotische Effekte zeigen kann (Huen and Cantley, 2015).

Folglich werden M1-Makrophagen mehr mit der Initiation und Aufrechterhaltung akuter Entzündungen, M2-Zellen mehr mit Heilung bzw. chronischer Inflammation und Fibrosierung in Verbindung gebracht (Lichtnekert et al., 2013; Sica and Mantovani, 2012). Eine scharfe Trennung erscheint schwierig. Die Unterteilung in funktionell polarisierte Subgruppen (M1 und M2) beruht jedoch vor allem auf *in vitro* Experimenten, die die Verhältnisse *in vivo* in ihrer Komplexität nur unzureichend nachbilden können. Dies bezieht sich auch auf die Herkunft, welche das Zellverhalten beeinflusst: aus dem Knochenmark bzw. zirkulierenden Vorläuferzellen oder residenten Gewebemakrophagen.

Ein Versuch, eine ähnliche, übertragbare Einteilung *in vivo* zu finden, nutzt den Oberflächenmarker Ly6C, der eine hohe, mittlere oder niedrige Expression aufweisen kann und auf CD11b⁺ Monozyten und Makrophagen zu finden ist (Lin et al., 2009; Zuk and Bonventre, 2016). Die CD11b⁺/Ly6C^{high}-Population erschien vor allem während der akuten Verletzungsphase nach Ischämie-Reperfusion im Gewebe, eine Depletion dieser Zellen vor Nierenschädigung führte zu einer Renoprotektion. Die CD11b⁺/Ly6C^{low}-Population präsentierte einen profibrotischen Phänotyp und ließ sich vor allem in der Phase der Krankheitsprogression nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigten CD11b⁺/Ly6C^{intermediate}- Makrophagen eine Wundheilungs-Gensignatur, dominierten vor

allem während der Reparationsphase und ihre Depletion war assoziiert mit verstärktem Gewebeschaden (Clements et al., 2016; Zuk and Bonventre, 2016).

Das Konzept dieser Unterteilung ist nicht als statisch zu betrachten: residente und neu rekrutierte Makrophagenpopulationen in bestimmten Habitaten von Geweben unterliegen dynamischen Prozessen aus Differenzierung, Infiltration, lokaler Proliferation, Seneszenz und Zelltod (Gordon et al., 2014). Plastizität und Flexibilität sind Schlüsselmerkmale mononukleärer Zellen und ihrer Aktivierungszustände: die funktionelle Polarisierung von M1/M2 Makrophagen kann *in vitro* umgekehrt werden, und pathologische Entwicklungen sind häufig assoziiert mit dynamischen Veränderungen der Makrophagen-Aktivierung. Dabei ist derzeit noch unklar, ob die beschriebene Dynamik durch neue Rekrutierung zirkulierender oder residenter Vorläuferzellen oder Differenzierung und „Umprogrammierung“ residenter Zellen *in situ* zustande kommt und welche Rolle dabei andere immunologische, wie z. B. T-Helferzellen, und nicht-immunologische Zelltypen spielen (Lichtnekert et al., 2013; Sica and Mantovani, 2012). Eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung spielen wohl auch das die Makrophagen umgebende Gewebe und die Signale, die sie von diesem erhalten (Lichtnekert et al., 2013). Als Beispiel zu nennen wären hier die oben bereits erwähnten DAMPs, die eine wichtige Art der Zell-Zell-Kommunikation im Verletzungsfall darstellen (Rosin and Okusa, 2011).

Aus diesen Beobachtungen sind drei Hypothesen über das *in vivo*-Verhalten von Makrophagen und deren Vorläuferzellen, den Monozyten, abgeleitet worden:

(1) Monozyten können sich in eine Vielzahl von Phänotypen differenzieren, abhängig von der jeweiligen Zytokin-Umgebung; (2) Monozyten können in verschiedene Subpopulationen mit vorprogrammierten Funktionen unterteilt werden; (3) funktionell polarisierte Subpopulationen von Makrophagen können ihre Form und Funktion je nach erhaltenen Signalen verändern (Duffield, 2010; Lin et al., 2009).

1.3.5 Die Bedeutung von Makrophagen bei chronischer Inflammation, Wundheilung und Fibrosierung in der Niere

Monozyten bzw. Makrophagen können den Prozess, der sich von normaler Wundheilung bis zur Entwicklung von Fibrose abspielt, sowohl durch direkte Beeinflussung des Matrix-Remodelings als auch Regulation von aktivierten Myofibroblasten dynamisch beeinflussen (Castaño et al., 2009). Sie werden häufig in direkter Umgebung von Collagen-produzierenden Zellen gefunden, werden unter der Wirkung von Chemokinen chemotaktisch in verletzte Gewebe geführt und produzieren diverse profibrotische Mediatoren wie beispielsweise TGF- β 1 und PDGF (Wynn and Barron, 2010).

Im Folgenden soll die aktuelle Studienlage zum Einfluss von Makrophagen und Monozyten auf den Inflammations- und Fibroseprozess in unterschiedlichen Schädigungsmodellen skizziert werden.

In einem Modell für Lupus-Nephritis mit nephrotoxischen antiglomerulären Antikörpern schien die Behandlung der untersuchten Mäuse mit einem Makrophagen depletierenden, selektiven CSF-1-Rezeptor-Kinase-Antikörper für den Erhalt einer normalen Nierenfunktion und eine signifikante Reduktion histopathologischer Veränderungen (endokapilläre Hyperzellularität und extrakapilläre Proliferation) zu sorgen (Chalmers et al., 2015).

Die Ablation von Makrophagen einer transgenen Maus (CD11b-DTR) konnte in einem Modell der rapid-progressiven Glomerulonephritis (RPGN) die Krankheitsprogression aufhalten. Dabei konnte nicht nur eine Abschwächung der histopathologischen Veränderungen, sondern auch eine verringerte Anzahl von Myofibroblasten sowie reduzierte interstitielle Deposition von Collagen III und TIMP-1 nachgewiesen werden (Duffield et al., 2005b). Des Weiteren ergaben sich Hinweise, dass die Depletion von Makrophagen zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose von tubulären und interstitiellen Zellen sowie einer verminderten Rekrutierung CD4⁺ T-Zellen in diesem Schädigungsmodell führt (Duffield et al., 2005b). Ähnliche Ergebnisse konnten durch antikörpermedierte Inhibition von CSF1-R in einem Glomerulonephritis-Modell der Ratte erzielt werden (Han et al., 2011).

Dass jedoch nicht alle Makrophagenspezies einen ungünstigen Effekt hinsichtlich der Entwicklung von Nierenschäden haben müssen, zeigen zum Beispiel die Ergebnisse von Ferenbach et al., (2012): In transgenen, den humanen Diphtherie-Toxin-Rezeptor (DTR) unter Kontrolle des CD11b-Promotors tragenden Mäusen kann zu einem definierten

Zeitpunkt durch Applikation von Diphtherie-Toxin (DT) die Makrophagenpopulation ablatiert werden. In einem Ischämie-Reperfusion-Modell führte die Ablation von Makrophagen mittels Diphtherie-Toxin nicht zu einem positiven Effekt auf die Nierenfunktion, sehr wohl aber die medikamentöse Behandlung der Versuchstiere mit Clodronat. Da letzteres Manöver im Gegensatz zur Behandlung transgener Mäuse mit DT nur zu einer inkompletten Elimination von Makrophagen führt, suggerieren die Ergebnisse die mögliche Existenz einer nephroprotektiven Population von Makrophagen (Ferenbach et al., 2012).

Auch scheint der Zeitpunkt der Ablation beim Ischämie-Reperfusion-Modell eine entscheidende Rolle zu spielen: Während Depletion von Makrophagen zum Zeitpunkt der I/R-Verletzung protektive Effekte hatte, war sie während der Reparaturphase mit verzögerten Heilungsprozessen assoziiert. Diese Beobachtung ließ sich durch adoptiven Transfer von ruhenden Makrophagen in zuvor Makrophagen-depletierte Mäuse bestätigen: hier resultierte der Transfer in den ersten 24h nach dem I/R-Eingriff in einer Re-Etablierung des Schadens, wohingegen bei späterem Transfer die Ausheilung begünstigt wurde (Huen and Cantley, 2015).

Dass es möglicherweise phasenspezifische, sich gegenüberstehende Funktionen für Makrophagen im Heilungsprozess gibt, die sich im zeitlichen Verlauf abwechseln, zeigte sich unter Anwendung der CD11b-DTR-Maus auch in einem Modell der Leberfibrose (Duffield et al., 2005a).

In einem Schädigungsmodell unilateraler ureteraler Obstruktion (UUO) sorgte die Leukozyten-Ablation mittels intraperitonealer Injektionen von 165 mg/kg Cyclophosphamid in der Spätphase (6 und 10 Tage nach UUO) für eine Aggravation der interstitiellen Fibrosierung, die durch adoptiven Transfer von Makrophagen abgemildert werden konnte (Nishida et al., 2005).

All diese Studien unterstützen die Hypothese, dass die *in vitro* festgestellten Aktivierungszustände in M1/M2 auch *in vivo* ein gewisses, wenn auch nicht ganz so eindeutig differenzierbares Korrelat haben. Es ist wahrscheinlich, dass beide Zelltypen sich gegenseitig ergänzen, gleichzeitig aktiv sind und in den Heilungsprozessen parallele Rollen spielen. Ein koordinierter Wechsel der Dominanz einer Population über die andere scheint dabei für Remodeling und Resolution der Entzündung wichtig und ein Exzess einer der beiden zum „falschen Zeitpunkt“ von Nachteil zu sein (Duffield, 2003).

Eine andere Arbeitsgruppe stellte mit Hilfe von I/R-Versuchen sowie eines weiteren Schädigungsmodells, das auf der Diphtherietoxin-vermittelten Apoptose proximaler

Tubuluszellen basiert, die Wichtigkeit der residenten Makrophagenpopulationen für die Reparaturphase bei diesen Schädigungsmodellen fest. Dabei waren sowohl die lokale Proliferation als auch die Polarisation der renalen Makrophagen und dendritischen Zellen abhängig von Signalen des Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktors (M-CSF; CSF-1) (Zhang et al., 2012), dessen Rezeptor, c-fms (CSF-1R), bereits erwähnt wurde.

Welche genauen Faktoren eine Migration von Makrophagen in die geschädigte Niere induzieren, einen Wechsel in Funktion und Phänotyp bestimmen und wie Makrophagen dann Heilung oder chronische Inflammation und Fibrose vorantreiben, ist Gegenstand intensiver Forschung.

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und Osteopontin konnten als wichtige Mediatoren der Monozyten- bzw. Makrophageninfiltration bei UUO-Versuchen identifiziert werden (Lange-Sperandio et al., 2002). Ein Fehlen von MCP-1 im Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie reduzierte die Infiltration von Monozyten und das Ausmaß einer ischämisch-fibrotischen Kardiomyopathie (Frangogiannis et al., 2007). Eine ebenfalls wichtige Rolle bei der Infiltration von Makrophagen in die verletzte Niere spielen Selectine. Selectine stellen eine Familie von speziellen Adhäsionsmolekülen dar, die auf der Oberfläche von Endothelien exprimiert werden und beim initialen Kontakt zirkulierender Leukozyten mit dem Gefäßendothel das sogenannte „rolling“ und die darauf folgende Extravasation und Migration initiieren (Lange-Sperandio et al., 2002).

Auch die für den Matrix-Umsatz (Gleichgewicht aus Auf- und Abbau der ECM) wichtigen MMPs haben einen Einfluss auf die Funktionsweise der Makrophagen. Es konnte gezeigt werden, dass die selektive Inhibition der MMP-2 in einer beschleunigten Fibrose-Entwicklung nach UUO, aber auch in verringerter Migration von Makrophagen in die geschädigte Niere in der Spätphase der Erkrankung resultiert. Beobachtungen aus *in vitro* Migrationsassays stützen die Hypothese, dass MMP-2 degradierte Bestandteile der ECM die Infiltration von Makrophagen fördern können, welche möglicherweise dem Zweck der Phagozytose dieser Bestandteile dienen (Nishida et al., 2007).

Zu weiteren regulatorischen Zytokinen zählt Galectin-3, ein β -Galaktosid-Bindungsprotein, das hochreguliert wird, wenn Monozyten sich zu Makrophagen differenzieren. Die Deletion des Galectin-3-Gens in Mäusen führte zu einer Reduktion des Fibrosegrads nach UUO, der adoptive Transfer von Wildtyp (WT)-Makrophagen in Galectin-3 Knock-Out-Mäuse führte zu vermehrter Fibrose. *In vitro* konnte dokumentiert

werden, dass Galectin-3-positive Makrophagen die Aktivierung renaler Myofibroblasten fördern (Henderson et al., 2008).

Makrophagen in der Niere sind nur eine von vielen Quellen für TGF- β , und dieses scheint nicht das einzige Effektor-Zytokin der Makrophagen zu sein (Duffield, 2010): Transgene Mäuse, in denen spezifisch das in Makrophagen produzierte TGF- β 1 ausgeschaltet war, zeigten weder nach I/R- noch UUO-Eingriffen eine signifikant verringerte fibrotische Entwicklung (Huen et al., 2013). Der von Makrophagen ausgeübte Einfluss auf fibrotische Prozesse in der Niere scheint daher zumindest nicht maßgeblich von ihrer Fähigkeit, TGF- β 1 zu synthetisieren und auszuschütten, abhängig zu sein.

Ein protektiver Faktor konnte in Serum Amyloid P (SAP) gefunden werden. Sowohl bei I/R- als auch UUO-Eingriffen konnte SAP das Ausmaß der Fibrose signifikant reduzieren. Weitere Untersuchungen ergaben, dass SAP spezifisch als Ligand an Fc γ -Rezeptoren von Makrophagen binden und einen anti-inflammatorischen Phänotyp mit erhöhter Produktion von IL-10 induzieren kann. Dabei scheint sich SAP als löslicher DAMP-Rezeptor spezifisch bei Schäden in der Niere anzureichern und dort apoptotische Zellen zu binden, die dann wiederum von Makrophagen-Fc γ R erkannt werden (Castaño et al., 2009). Dies passt zu *in vitro* Experimenten, die suggerieren, dass die Induktion von Apoptose und die darauf folgende Phagozytose der getöteten Zelle inflammatorische Makrophagen derart alterieren können, dass sie die Exkretion von TNF- α herunter- und die von TGF- β 1 heraufregulieren (Duffield, 2003).

Eine Möglichkeit, die Heilung positiv zu beeinflussen, könnte die Einflussnahme auf den Wnt-Signalweg darstellen. Wnt ist ein Akronym aus Wg für „wingless“, welches aus der genetischen Forschung mit Drosophila-Fliegen stammt, und Int-1, einem Gen, welches bei Mäusen Brustkrebs fördern kann. Bisher ist dieser Signalweg vor allem für Zellproliferation während der Embryonalentwicklung und bei Neoplasien bekannt. Studien einer Kreuzung der bereits bekannten CD11b-DTR-Maus mit einer Wnt-Reporter-Maus im I/R-Modell sprechen dafür, dass die Reparatur beschädigter Tubuli abhängig ist von Wnt7b, das lokal durch infiltrierende Makrophagen produziert wird. Es gibt Hinweise darauf, dass Gene, die Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Laminin kodieren, ebenfalls einer Regulation durch den Wnt-Signalweg unterliegen (Lin et al., 2010).

Um die genauen biologischen Eigenschaften und Funktionen von Makrophagen in gesundem Nierengewebe sowie bei inflammatorischen Pathologien der Niere *in vivo* besser zu verstehen, wäre es von großem Interesse, zu verschiedenen Zeitpunkten ein

„reines“ Genexpressionsprofil bzw. eine genetische Signatur dieser Zellpopulation zu gewinnen. Dies erscheint essenziell, um die pathophysiologische Rolle und den präzisen Beitrag von Makrophagen zum Krankheitsverlauf zu definieren. Die Niere als auf zellulärer Ebene hoch heterogen organisiertes Organ stellt uns hierbei vor große Herausforderungen. Die meisten bislang erwähnten Arbeiten beschreiben Auswirkungen von Depletion ganzer Zellpopulationen oder das Ausschalten relevanter Gene und schließen so indirekt auf die Existenz und Bedeutung distinkter Makrophagenspezies. Will man jedoch zelltypspezifische Informationen im Sinne genetischer Expressions- und Translationsprofile gewinnen, benötigt man bessere, maßgeschneiderte Modelle.

1.4 Polysomen und TRAP (Translational Ribosome Affinity Purification)

1.4.1 mRNA

Die mRNA (messenger-RNA) spielt eine zentrale Rolle bei der „Übersetzung“ der in den Basenpaaren der DNA hinterlegten Information in Proteine und Enzyme. Sie trägt die Information als Kopie oder Transkript aus dem Zellkern zu den extranukleär gelegenen Ribosomen. Eukaryontische mRNA entsteht im Zellkern aus so genannter heterogener nukleärer RNA (hnRNA). hnRNA ist hierbei das primäre Ergebnis der Transkription eukaryontischer Strukturgene. Letztere sind mosaikartig organisiert: es finden sich Exons, welche später die mRNA repräsentieren, und Introns, zwischen den Exons liegende, nicht kodierende Basensequenzen. Beim Zuschnitt der mRNA werden Introns entfernt und Exons miteinander verknüpft. Außerdem wird am 5'-Ende die sogenannte Cap-Struktur angehängt, welche aus einem methylierten Guanodin besteht. Zuletzt wird am 3'-Ende ein poly-Adenosin-Schwanz aus 50-200 Adenylat-Resten angehängt. Diese Prozesse der Nachbearbeitung der mRNA nennen sich „capping“ und „splicing“ (Rassow et al., 2016).

Der auf diese Nachbearbeitung folgende Schritt ist die Translation. Hierunter versteht man die Übersetzung der Basensequenz der mRNA in eine Aminosäuresequenz. Sie findet im Zytoplasma statt, in der Regel in räumlicher Nähe zum endoplasmatischen Retikulum (ER), in welchem Proteine und Enzyme co- und posttranslational modifiziert und gefaltet werden. Ribosomen können Proteine bereits während des Translationsprozesses in das endoplasmatische Retikulum überführen. Bereiche des ERs,

welche so mit Ribosomen überzogen sind, werden aufgrund ihres elektronenmikroskopischen Aussehens als „raues ER“ bezeichnet. Zudem kann eine mRNA synchron von mehreren Ribosomen gleichzeitig für die Translation genutzt werden, wodurch die Effizienz gesteigert werden kann. Dieses Gefüge aus mRNA mit mehreren, gebundenen Ribosomen nennt man Polysom (Rassow et al., 2016).

1.4.2 Ribosomen und Polysomen

Ribosomen sind komplexe Nucleoproteinpartikel und bestehen aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten, welche wiederum aus ribosomaler RNA (rRNA) und einer Vielzahl kleiner ribosomaler Proteine aufgebaut sind. So enthält die kleine 40S-Untereinheit des eukaryontischen Ribosoms eine 18S-rRNA und 33 Proteine. Die größere 60S-Untereinheit ist aus drei Arten rRNA unterschiedlicher Länge und 49 Proteinen aufgebaut. Insbesondere in Zellen, welche eine intensive Protein-Biosynthese aufrecht erhalten, sind Ribosomen perlschnurartig entlang eines mRNA-Moleküls aufgereiht als Polysomen (Koolman and Röhm, 2003).

Für die Grundlagenforschung sind Polysomen und deren gebundene mRNA in vielerlei Hinsicht interessant. Die etablierten Methoden der Expressionsanalyse beschränken sich meist jedoch auf Messungen und Analysen der nicht polysomal gebundenen mRNA und haben hierdurch kritische Limitationen. Die Konzentration von mRNA ist jedoch ein ungenaues Surrogat für die tatsächliche Proteinproduktion einer Zelle, da mRNAs nach ihrer Transkription ebenso wie während ihrer Translation vielfältigen Regulations- und Nachbearbeitungsprozessen unterliegen. Es konnte gezeigt werden, dass polysomal gebundene mRNA besser mit der eigentlichen Proteinexpression korreliert als die gesamte mRNA einer Zelle (Ingolia et al., 2009).

1.4.3 TRAP-Methodik

Eine kritische Limitation für Analysen des Transkriptom der Niere *in vivo* ist die bereits erwähnte zelluläre Komplexität von Nierengewebe: Daten aus dem gesamten Gewebe reflektieren keine einzelne Zellpopulation, sondern die durchschnittliche Expression der untersuchten Gene von über 26 verschiedenen Zelltypen. Diese Einschränkung verstärkt sich umso mehr bei einer Vielzahl von Krankheitszuständen, in denen Entzündungszellen

das Gewebe infiltrieren und die normale Gewebearchitektur durch Fibrosierung zerstört wird.

Bisherige Lösungsansätze für dieses Problem umfassen *Durchflusszytometrie und Sorting* (FACS = fluorescence-activated cell sorting), *Laser-capture-microdissections* (LCM) und *Dynabead Perfusion*. Das FACS ist ein Versuch, dieses Problem zu lösen und einzelne Zelltypen auch in soliden Geweben zur Analyse mittels fluoreszenzbasierter Antikörpermarkierung zu isolieren (Brunskill et al., 2011). Allerdings existieren nicht für alle Zielstrukturen die passenden Antikörper gegen zelluläre Oberflächenantigene. Außerdem induziert der für das FACS-Verfahren zwingend notwendige Prozess des enzymatischen Gewebeverdaus und der mechanischen Disaggregation transkriptionalen Stress, der schnell zur Verzerrung naiver Expressionsprofile führen kann (Hu et al., 2016; Kang et al., 2017). Eine weitere Alternative stellen LCM an gefrorenem Gewebe dar. Hierbei wird, vereinfacht dargestellt, ein transparenter thermoplastischer Film auf die Oberfläche eines präparierten Gewebes appliziert und mit einem Laser genau über den Zielzellen aktiviert. Durch lokale Adhäsion können die Zielzellen nun vom restlichen Gewebe getrennt werden (Emmert-Buck et al., 1996). Allerdings können aufgrund der räumlichen Nähe unterschiedlicher Zellpopulationen in kompakten Geweben wie der Niere interstitielle nicht sicher von nicht-interstitiellen Zelltypen getrennt werden, insbesondere im Hinblick auf fibrotisch zerstörtes Gewebe. Ebenso führt die durch den Laser entstehende Hitze zu RNA-Degradierungen. Gleiches gilt für die Dynabead-Perfusion, bei welcher winzige magnetische Kügelchen eines bestimmten Durchmessers in den Maus-Organismus infundiert werden und sich in den Glomerula sammeln bzw. „hängenbleiben“, welche dann nach einem partiellen Gewebsverdaus isoliert werden können (Takemoto et al., 2002). Die Nachteile und Limitationen ähneln denen der vorausgehend erwähnten Methoden.

TRAP (= translational ribosome affinity purification) stellt einen neuartigen Ansatz dar, um diese Probleme zu umgehen und zellspezifisch mRNA von genetisch definierten Zelltypen zu isolieren (Grgic et al., 2014b). Die Basis hierfür ist die Induktion der Zelltyp-spezifischen Expression eines eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein)-markierten ribosomalen Proteins, welches dann als Vehikel dienen kann, polysomal gebundene - und damit translatierte - mRNA dieses speziellen Zelltyps anzureichern und zu analysieren.

Zur Realisierung bedarf es zunächst der Herstellung eines Transgens mit einem Zelltyp-spezifischen Promotor, welcher die Expression eines eGFP-markierten ribosomalen Proteins L10a antreibt. Das Transgen tragende Mäuse exprimieren nun dieses eGFP-L10a Fusionsprotein nur in einem spezifischen, vom Promotor definierten Zelltyp. Nun kann das gesamte Zielorgan rasch und ohne enzymatischen Verdau homogenisiert werden und das Homogenisat einer Immunpräzipitation unterzogen werden. Hierbei werden dem Homogenisat magnetische Kügelchen beigefügt, welche zuvor mit monoklonalen Antikörpern gegen eGFP überzogen wurden. Nach erfolgreicher Immunpräzipitation liegen zwei Fraktionen vor: eine gebundene, zelltypspezifische Fraktion und eine ungebundene, das restliche Organ repräsentierende Fraktion. Die auf diese Art gewonnenen distinkten RNA-Fraktionen können nun auf verschiedene Art analysiert werden. In Frage hierfür kommen vor allem MicroArray-Analysen und RNA-Sequenzierungen, gefolgt von einem Abgleich mit Gendatenbanken.

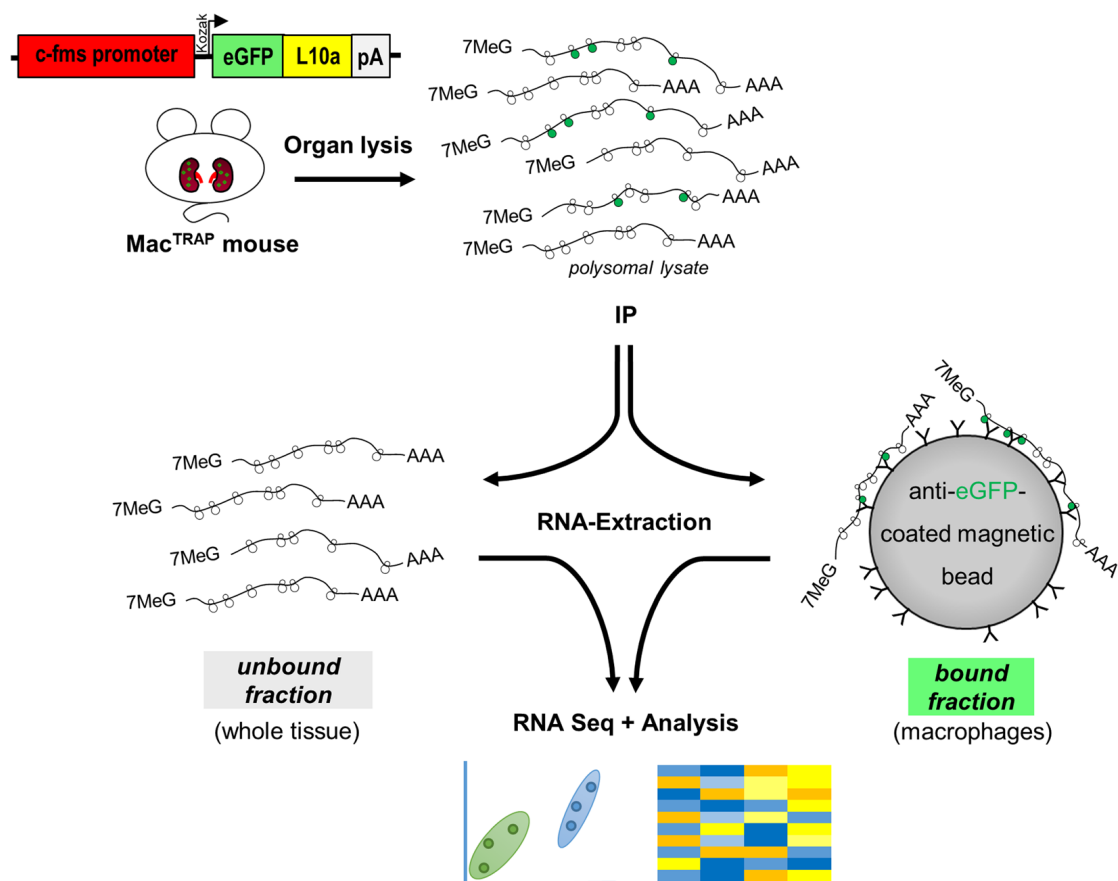


Abbildung 1: Schematische Illustration der TRAP-Methode: Eine makrophagenspezifische Expression der ribosomalen Untereinheit L10a, mit angehängtem eGFP, wird mittels des cfms Promotors gewährleistet. Die Polysomen der sogenannten Mac^{TRAP}-Maus werden mittels anti-eGFP beads immunopräzipitiert. Das Resultat ist eine gebundene, zelltypspezifische Fraktion und eine ungebundene Fraktion, die das ganze Organ repräsentiert. Die isolierte mRNA kann dann auf verschiedene Arten (z. B. Sequenzierung) analysiert werden. (Modifiziert nach Hofmeister et al., 2020)

Dieser Ansatz wurde erstmals erfolgreich für Neuronen demonstriert und half hier bei der Identifikation und Beschreibung verschiedenster genetisch definierter Zellpopulationen (Heiman et al., 2008) sowie in der Niere zur Beschreibung der Translationsprofile von Myofibroblasten und Podozyten in Ruhe und unter zellulärem Stress im Schädigungsmodell (Grgic et al., 2014a, 2014b). Hier konnte eine Vielzahl von differentiell regulierten Genen identifiziert werden, die bei der groben Analyse von Gesamtnierengewebe mit seinen mehr als zwei Dutzend verschiedenen Zelltypen durch erhebliche Verdünnung einzelner Vertreter untergegangen wäre. Des Weiteren bilden diese Ergebnisse die polysomal gebundene und somit auch wirklich translatierte RNA ab, welche genauer die tatsächliche Protein-Expression in der Zelle reflektiert als herkömmliche Expressionsprofile (Doyle et al., 2008; Ingolia et al., 2009). Das Anwenden der Methode auf Gewebsmakrophagen könnte einen wichtigen Erkenntnisgewinn versprechen und potenziell zur Entdeckung neuer krankheitsrelevanter Gene sowie nützlicher Biomarker oder therapeutischer Zielstrukturen führen. Ein hierfür theoretisch geeigneter Promotor, der dem eGFP-L10a-Konstrukt zum Beispiel vorangeschaltet werden könnte, wäre das bereits erwähnte *c-fms*. Dieser Promotor und das von ihm kontrollierte endogene Gen werden im Folgenden kurz beschrieben.

1.5 Eigenschaften von *c-fms*/CSF-1R

Das vom *c-fms* Gen kodierte Protein ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase für den Koloniestimulierenden Faktor 1 (CSF-1), welcher die Produktion, Differenzierung und Funktion von Makrophagen kontrolliert (Sauter et al., 2014). Durch diese zentrale Funktion gilt der Rezeptor als etablierter spezifischer Marker von mononukleären Phagozyten *in vivo* (Sasmono et al., 2003). Seine Expression ist außer in Makrophagen in Placentatrophoblasten und menschlichen Brust-, Ovarial- und Endometriumtumoren hochreguliert (Zhenilo et al., 2015). Tiere mit Mutationen bzw. Knock-out des CSF-1R-Gens sind zwar lebensfähig, entwickeln jedoch neben einer sehr eingeschränkten Abwehrfunktion erhebliche Gedeihstörungen mit Defiziten in der Entwicklung von Knochenstrukturen, ZNS, Pankreas, Brustdrüse sowie Störungen männlicher und weiblicher Fortpflanzungsfähigkeit. Dies unterstreicht die Relevanz von *c-fms* für die normale Entwicklung (MacDonald et al., 2010). Dabei ist die *c-fms*-mRNA schon in den frühesten Dottersack-Phagozyten, viel früher als viele andere Marker, detektierbar (Sasmono et al., 2003).

Die langfristige Blockade von CSF-1R mittels Antikörper bei adulten Mäusen konnte die vielfältigen, schwerwiegenden Effekte des kompletten Ausfalls nicht nachbilden. Dies unterstreicht die Annahme, dass im adulten Organismus nach Abschluss der Entwicklung c-fms-Signale vor allem für das Aufrechterhalten der Monozyten-/Makrophagenpopulationen von Bedeutung sind (MacDonald et al., 2010; Sauter et al., 2014). Deshalb erscheint, auch im Hinblick auf die Effekte von CSF-1-vermittelten Signalen in verschiedenen Schädigungsmodellen der Niere, der c-fms-Promotor als erfolgversprechende Komponente für den makrophagenspezifischen TRAP-Ansatz.

1.6 Zielsetzung

Es herrscht allgemeiner Konsens, dass residente Makrophagen sowohl eine wichtige Rolle beim Erhalt der Homöostase von Organen einschließlich der Niere spielen als auch maßgeblich an inflammationsgetriebenen pathophysiologischen Prozessen und konsekutiven Reparationsvorgängen beteiligt sind. Trotz intensiver Bemühungen sind die zu Grunde liegenden Mechanismen und Wechselwirkungen, mit denen Makrophagen zum Beispiel Fibroseprozesse in der Niere beeinflussen, nur unzureichend geklärt.

Die Methode der *Translational Ribosome Affinity Purification* eröffnet die Möglichkeit, in einem Ein-Schritt-Verfahren polysomale zelltypspezifische mRNA anzureichern und im Folgeschritt detailliert zu analysieren. Um die TRAP-Technologie für Makrophagen anwenden zu können, wurde das Ziel definiert, die kürzlich generierte transgene „makrophagen-spezifische“ TRAP-Mauslinie (Mac^{TRAP}), zu charakterisieren und zu validieren:

Das normale Wachstum der Mäuse sollte mittels regelmäßiger Messungen des Körpergewichts und Vergleich mit Literaturangaben überprüft werden. Die Entwicklung sollte außerdem durch makroskopische Analysen von Organen vergleichend studiert werden, um etwaige Auffälligkeiten im Phänotyp zu erfassen.

Im nächsten Schritt sollte die Induzierbarkeit der cfms-eGFP-L10a-Transgenexpression unter proinflammatorischer Stimulation mittels quantitativer RT-PCR von fibrosierenden UUO-Nieren und ungeschädigten Kontrollnieren überprüft und quantifiziert werden. Ferner wurde angestrebt, das induzierte Transgenprodukt (eGFP-L10a) auch auf Proteinebene mittels Western Blot in fibrotischen Mac^{TRAP}-UUO-Proben nachzuweisen und so die erfolgreiche Translation zu untermauern.

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen nephrohistologischer CLK und UUO-Proben von Mac^{TRAP}-Mäusen sollte schließlich untersucht werden, ob das eGFP-L10a-Fusionsprotein wirklich wie angenommen spezifisch in Makrophagen translatiert wird und folglich dort nachweisbar ist.

Durch die sorgfältige Validierung von Mac^{TRAP} sollte eine solide Grundlage und wichtige Voraussetzung für die Anwendung dieser neu generierten TRAP-Mauslinie als effektives Werkzeug für die Erforschung der Biologie von renalen Makrophagen im gesunden und erkrankten Nierengewebe geschaffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Axio Observer Z.1 Mikroskop: Carl Zeiss AG; Oberkochen, D
- Digitale Kompaktkamera Cybershot G: Sony; Berlin, D
- Elektrophoresebad Agagel Mini Biometra: Biomed-Analytik; D
- Fast Real-Time PCR System: Applied Biosystems; Darmstadt, D
- FUSION-FX7 Advance-Superbright (4,2/10 Mio Pixel CCD-Kamera): PeqLab; Erlangen, D
- Laborwaage BP310P: Sartorius; Göttingen, D
- Leica CM1950 Kryotom: Leica Microsystems; Wetzlar, D
- Mikrofuge (heraeus Pico 17 Centrifuge): Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, D
- Nanodrop 2000c: PeqLab; Erlangen, D
- Operationsbesteck: FST (Fine Science Tools); Heidelberg, D
- Pipetten: Eppendorf Reference 2/ Research Plus: Eppendorf AG; Hamburg, D
- Thermocycler GeneAmp PCR System 2700: Applied Biosystems; Darmstadt, D
- Tischzentrifuge: Thermo Electron Corporation; Karlsruhe, D
- UV-Transilluminator Gene Genius: Syngene; Cambridge, GB
- Vortex-Gerät: Thermo Scientific; Wedel, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien / Zubehör

- 0,5 ml/1,5 ml/2 ml Reaktionsgefäße: Sarstedt; Nümbrecht, D
- Fisher Superfrost Plus Objektträger: Fisher; Venice, USA
- PCR-Plate, Abgene SuperPlate: Thermo Scientific; Waltham, USA
- Perma-Hand Seide, 4-0, 6 x 45 cm, steril, nicht resorbierbar: Ethicon; Norderstedt; D
- Spritzenzubehör:
- BD plastik steril, 1 ml Spritze: BD Biosciences; Heidelberg, D
- BD Microlance 3 Steril, 0,45 x 13 mm (braun): BD Biosciences; Heidelberg, D

2.1.3 Chemikalien

- Acrylamid/Bisacrylamid: Roth; Karlsruhe, D
- Agarose: Fermentas; St. Leon- Rot, D
- Ammoniumperoxidsulfat: Roth; Karlsruhe, D
- Aqua demineralisiert/ Aqua bidest
- Bovine Serum Albumine (BSA): Thermo Scientific; Waltham, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Invitrogen/Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
- Dithiothreitol (DTT): Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- DNA Ladder 50bp: peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, D
- dNTP-Mix: peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, D
- EDTA: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Ethanol absolute: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Fetales Kälberserum (FCS): PAA Laboratories GmbH; Cölbe, D
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain: Biotium; Hayward, USA
- Glutaraldehyde-Solution 2 %: Appli Chem; Darmstadt, D
- Glycin: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- IGEPAL CA-630: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Isofluran: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- iTaq Universal SYBR Green Supermix: Bio-Rad; München, D
- Methanol: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- NaCl: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- NaOH: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Natriumazid: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Nitrocellulose-Membran: Bio-Rad ; München, D
- Normal Goat Serum (NGS): PAA Laboratories GmbH; Cölbe, D
- Nuclease- Free Water: peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, D
- Optimal cutting temperature compound Gel: Sakura FineTek; Torrance, US
- Paraformaldehyd: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder: Thermo Scientific; Waltham, USA
- PBS mit/ohne Ca²⁺/Mg²⁺: PAA Laboratoris GmbH; Cölbe, D
- Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit: Thermo Scientific; Waltham, USA
- Primer Maus: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D

- Pro Long Antifade Reagents: Life Technologies GmbH; Darmstadt, D
- Protease Inhibitor Cocktail Complete: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Resolving Gel Buffer: Bio-Rad; München, D
- Roti-Load 1: Roth; Karlsruhe, D
- Skim Milk Powder: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Sodium Dodecyl Sulfate: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Stocking Gel Buffer: Bio-Rad; München, D
- Succrose: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate: Thermo Scientific; Waltham, USA
- TEMED: Roth; Karlsruhe, D
- Trichloressigsäure: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Tris/HCl: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
- Triton-X 100: Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D

2.1.4 Antikörper und Sekundärreagenzien

- Antikörper (Western Blot):
 - Anti-GFP-Antibody GFP-1010: Aves Labs Inc.; Tigard, OR, USA (Verdünnung 1:2000)
 - GAPDH Antibody Rabbit Polyclonal: Bethyl Laboratories; Montgomery, USA (Verdünnung 1:2000)
- Antikörper (Immunfluoreszenz):
 - Anti-F4/80 antibody ab6640: abcam; Cambridge, GB (Verdünnung 1:1000)
 - Rb Anti-CD3(SP7) Mab: Spring Bioscience/ Biomol; Hamburg, D (Verdünnung 1:300)
 - Anti-GFP-Antibody GFP-1010: Aves Labs Inc.; Tigard, OR, USA (Verdünnung 1:250)
 - Purified Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) 558736: BD Biosciences Pharmingen; Heidelberg, D (Verdünnung 1:600)
 - Anti-Mouse CD 140b (PDGFR β) Purified, Clone APB5: eBioscience; Frankfurt am Main, D (Verdünnung 1:800)
- Sekundäre Antikörper und Sekundärreagenzien

- Fluorescein (FITC)-labeled Goat Anti-Chicken IgY: Aves Labs Inc.; Tigard, USA
- Monoclonal Anti-Actin, α -Smooth Muscle-Cy3 antibody produced in mouse: Sigma Aldrich; St. Louis, USA (Verdünnung 1:250)
- Goat Anti-Chicken IgG, HRP-konjugiert: Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz, USA (Verdünnung 1:10000)
- Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-konjugiert: Santa Cruz Biotechn.; Santa Cruz, USA (Verdünnung 1:10000)
- Goat Anti-Rat, Alexa Fluor 555 (Cy3): Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA (Verdünnung 1:400)
- Goat Anti-Rabbit, Alexa Fluor 555 (Cy3): Invitrogen/Life Technologies; Carlsbad, USA (Verdünnung 1:400)

2.1.5 Standards

- Standard für Agarose-Gelelektrophorese:
DNA Ladder 50bp (peqLab Biotechnology GmbH; Erlangen, D):
50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp
- Standard für SDS-Gelelektrophorese:
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific; Waltham, USA): 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa
- Standard für Proteinbestimmung:
Bovine Serum Albumine/BSA (Thermo Scientific; Waltham, USA):
0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml

2.1.6 Kit-Systeme

- iScript cDNA Synthesis Kit: Bio-Rad; München, D
- Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit: Thermo Scientific; Waltham, USA
- RNeasy Mini Kit: QIAGEN; Hilden, D

2.1.7 Puffer und Lösungen

- Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer:
 - 50mM Tris
 - 150 mM NaCl
 - 0,5 % Desoxycholsäure
 - 1 % Igepal
 - 1 % Protease Inhibitor
- 1x PAGE-Elektrodenpuffer:
 - 19,2 mM Glycin
 - 2,5mM Tris Base
 - 0,1 % SDS
- 1x Blotpuffer:
 - 19,2 mM Glycin
 - 2,5mM Tris Base
 - 20 % Methanol
- Blockpuffer (Western Blot):
 - 5 % Milchpulver (fettfrei) in
 - 1x TBS/T
- Blocklösung (Immunfluoreszenz):
 - 10 % NGS in PBS
- Stripping-Puffer:
 - 0,25 mM Glycin
 - 1 % SDS
 - pH 2,0 mit HCl eingestellt
- 1x TAE-Puffer:
 - 40 mM Tris
 - 1 mM EDTA, pH 8,0
 - 20 mM Eisessig
- 1x TBS/T:
 - 2 mM Tris-HCl
 - 13,7mM NaCl
 - pH 7,6 (mittels HCl titriert)
 - 0,1 % Tween 20

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Generierung der transgenen Mac^{TRAP}-Maus

In Vorarbeiten wurde angestrebt, eine neuartige makrophagenspezifische transgene TRAP-Maus (Mac^{TRAP}) zu generieren. Hierfür wurde zu Beginn ein Transgen hergestellt, welches ein artefizielles Fusionsprotein aus eGFP und L10a (ribosomales Protein) unter der Kontrolle des makrophagenspezifischen c-fms-Promotors exprimiert. Hierfür wurde mittels PCR-Klonierung (Topo-Cloning) ein Adapter an den c-fms-Promotor angehängt, um eine Pac1-Restriktionsstelle einzubringen. Durch Pac1/Sal1-Verdau konnte gerichtet die eGFP-L10a-Kassette in das backbone des c-fms-Plasmids integriert werden. Zur Validierung erfolgte im nächsten Schritt die Sequenzierung des neuen Plasmids und schließlich ein finaler Verdau mit Mlu1/Sal1 zur Linearisierung, Auftrennung, Extraktion und Aufreinigung des Transgens.

Dieses wurde dann erfolgreich mittels pronukleärer Injektion in das Genom von F1-hybriden Mausembryonen (Gene Modification Facility, Harvard University) integriert (Hofmeister et al., 2020). Diese Embryonen wurden in der Folge in pseudoschwangere Weibchen eingebracht und von diesen ausgetragen. Die hieraus resultierenden Würfe wurden danach genotypisiert und die für eGFP-L10a positiven „founder-Linien“ weiter gekreuzt und die Nachkommen entsprechend validiert.

Das linearisierte Transgen cfms-eGFP-L10a konnte auf diese Art erfolgreich in das Genom einer Mauslinie mit „mixed background“ aus C57BL/6J und DBA/2J eingefügt werden. Später wurde diese fortan Mac^{TRAP} genannte Mauslinie auf einen reinen „black six“ Hintergrund zurückgekreuzt. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten basieren jedoch zum Teil noch auf dem „mixed background“.

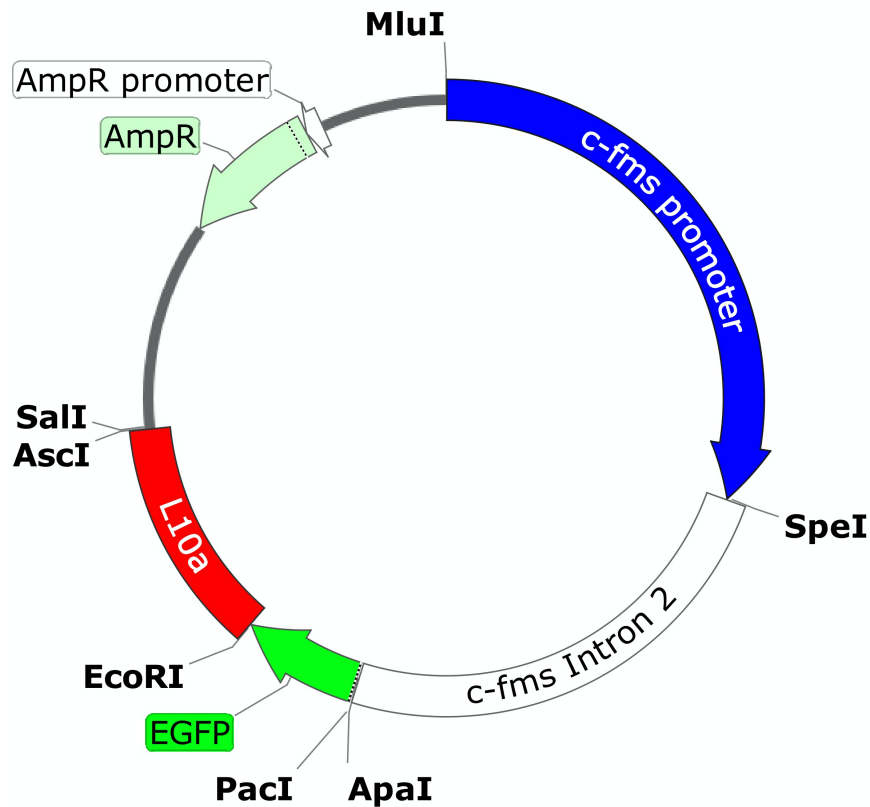


Abbildung 2: Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids

2.2.2 Tierhaltung

Alle für die biometrischen Analysen verwendeten Tiere wurden in der Tierhaltung des BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum der Universität Marburg) mit einer Maximalzahl von 6 Tieren pro Käfig gehalten. Bei den Käfigen handelte es sich um ‚individually ventilated cages‘ (IVC), die einen hohen hygienischen Standard ermöglichen und auf $22 \pm 2^\circ\text{C}$ temperiert wurden. Die Mäuse wurden mit Standard-Nagerkost und Wasser ad libitum versorgt und unterlagen einem Hell/Dunkel-Zyklus von 12 Stunden.

Der tierexperimentelle Teil (UUO-Experimente; unilaterale ureterale Obstruktion) wurde in Kooperation im Labor von Prof. Dr. Humphreys (Renal Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA) durchgeführt, und die Proben wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Biometrische Analysen

Um sicherzustellen, dass das Einfügen des Transgens ins Genom der Mauslinie keine unerwarteten gravierenden Störungen oder Fehlbildungen induziert, wurden die Mäuse biometrischen Analysen unterzogen.

2.2.3.1 Wachstumsbeobachtung

Heranwachsende Nachkommen aus der Zucht wurden bis zu einem Alter von ca. 2 Monaten regelmäßig in Abständen von etwa einer Woche gewogen und auf phänotypische Auffälligkeiten untersucht. Die erhobenen Daten wurden mit den Wachstumskurven der C57BL/6J- bzw. DBA/2-Linie (Jackson Laboratory) verglichen.

2.2.3.2 Organgrößenvergleich und makroskopische Untersuchung

Zur makroskopischen Untersuchung der inneren Organe wurden je 10 männliche und weibliche Mac^{TRAP}-Tiere im Alter von 3-6 Monaten herangezogen. Nach Bestimmung des Körpergewichts wurden die Mäuse mittels Isofluran in tiefe Narkose versetzt und durch zervikale Dislokation für wissenschaftliche Zwecke getötet. Anschließend wurden der Reihe nach Leber, Milz, beide Nieren, Lunge und Herz entnommen, auf makroskopische Auffälligkeiten untersucht, gewogen und die Organengewichte mit jenen von Vergleichstieren eines entsprechenden genetischen Hintergrunds sowie Literaturangaben verglichen. Die entnommenen Organe wurden ebenfalls vermessen und fotografiert und ein Teil für weitere nachgeschaltete Gewebsanalysen asserviert.

2.2.4 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Zur regelmäßigen Genotypisierung neuer Jungtiere wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze in 200 µl Lysepuffer (50mM NaOH) bei 95°C im Heizblock mit Rüttelplatte (1300 rpm) für 10 min lysiert. Anschließend wurde mit 50 µL TrisHCl neutralisiert und das Lysat 1 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Zelldebris von gelösten Nukleinsäuren zu trennen.

Für die Detektion des eGFP-L10a-Konstrukts mittels PCR wurden die Primer (Tabelle 1) in einer Konzentration von 25 μM verwendet. Das kalkulierte PCR-Produkt für das Transgen hatte eine Größe von ca. 500 Basenpaaren. Je PCR-Tube wurden 1 μl DNA-Probe als Template mit 14 μl Mastermix pipettiert. Die Mengenverhältnisse des für die PCR verwendeten Mastermixes und das Temperaturprofil sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

A Mastermix	Volumen/Tube	B Temperatur	Zeit
H ₂ O	9,87 μl	94°C	4:00 min
Puffer Y	1,56 μl	94°C	0:30 min
MgCl ₂	1,56 μl	58°C	1:00 min
dNTPs	0,62 μl	72°C	1:00 min
Primer Mix (25 μM)	0,244 μl	72°C	10:00 min
Taq Polymerase	0,16 μl	4°C	∞
C Primersequenz	Sense: 5'-GGCATCGACTTCAAGGAGGA Antisense: 5'-GGTCGTAGTTCTTCAGGCTGA		

Tabelle 1: Ansatz für die Genotypisierung. **A** (links): PCR-Mastermix zur Routine-Genotypisierung. **B** (rechts): Temperaturprofil des Thermocyclers. Die grün hinterlegten Zellen wurden der Reihe nach 40 Zyklen wiederholt. **C** (unten): Sequenz des zur Genotypisierung verwendeten Primers für das eGFP-L10a-Konstrukt.

Das Temperaturschema einer PCR unter Verwendung einer hitzebeständigen Taq-Polymerase basiert im Allgemeinen auf der notwendigen Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 94°C, der Primer-Anlagerung an die Einzelstränge bei 58°C und der DNA-Elongation durch die Polymerase bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus der PCR wurde jede Probe mit 3 μL loading dye versehen. Diese Farbsubstanz ermöglicht die visuelle Verfolgung der Laufbande während der Gelelektrophorese und sorgt durch Zusatz von Glycerol für ein Absinken der Proben-DNA auf den Boden der Geltasche. Für die Auswertung der Genotypisierungs-PCR wurde ein 1,5%iges Agarosegel (2,25g Agarose auf 150 ml TAE (Tris EDTA Acetat-Puffer) gegossen, welches GelRED (1:50000) enthielt. GelRED interkaliert wie Ethidiumbromid zwischen den Basen der DNA und kann durch ultraviolettes Licht angeregt werden, wodurch sich Nukleinsäuren im Gel sichtbar machen lassen. Zur Größenabschätzung wurde eine 50 bp DNA-Leiter verwendet.

Eine Unterscheidung zwischen heterozygoten und homozygoten eGFP-L10a-Transgen-Trägern ist nicht ohne weiteres möglich, die Verteilung unter den Nachkommen kann

allerdings einen Hinweis liefern. Eine reine Wildtyp-Maus ohne Transgen würde folglich in der Genotypisierung keine Bande aufweisen.

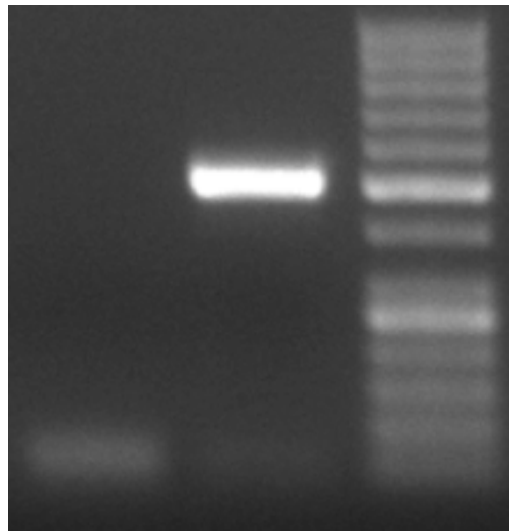


Abbildung 3: Beispiel einer positiven Genotypisierung.

2.3 Unilaterale Ureter-Obstruktion (UUO): Induktion einer Nierenfibrose

Alle UUO-Experimente wurden im Rahmen einer Kooperation am Harvard Institute of Medicine durchgeführt.

Zusammensetzung der Narkosemittel	
Rompun 20 mg/ml	0,1 ml
Ketanest 25 mg/ml	0,2 ml
NaCl 0,9 %	0,7 ml
Verabreichungsschema	
10-22 g Körpergewicht	0,20 ml i.p.
22-32 g Körpergewicht	0,25 ml i.p.
33-42 g Körpergewicht	0,30 ml i.p.

Tabelle 2: Narkosemittel. Oben: Zusammensetzung der anästhetischen Medikation. Unten: Dosierung nach Körpergewicht.

Zur Betäubung und peri-/postoperativen Analgesie wurde den Mäusen nach obigem Schema die Narkosemedikation intraperitoneal verabreicht. Nach Einsetzen der Anästhesie folgte ein 1,5-2 cm langer linksseitiger Flankenschnitt durch Haut und Peritoneum. Der linke Ureter wurde aufgesucht und unterhalb des Nierenbeckens doppelt

mit einem Faden der Stärke 4-0 durch einen chirurgischen Knoten abgebunden. Anschließend wurde das OP-Feld mit isotoner NaCl-Lösung gespült und die Wunde mit einem Klammernahtgerät verschlossen. Die Tiere wurden bis zum Nachlassen der Narkose unter einer Rotlichtlampe überwacht.

Sieben Tage nach UUO-Manöver (im Folgenden: 7 d UUO) wurden die Tiere mit Isofluran anästhesiert, getötet, der Thorax geöffnet und unmittelbar im Anschluss per ventrikulärer Punktion mit eiskaltem PBS-Phosphatpuffer linksventrikulär perfundiert. Nach Eröffnung des Abdomens wurden die geschädigte UUO-Niere und die gesunde kontralaterale Niere (CLK = contralateral kidney) entfernt. Die Nieren wurden mit einem Skalpell zur Gewebsservierung entsprechend portioniert.

Ein Teil der Niere wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der andere Teil wurde für die Anfertigung von Kryoschnitten entsprechend vorbereitet: Zur Präfixierung wurden die Nierenstücke 1 Stunde auf Eis in 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert und anschließend in 30 % eiskalter Saccharose (in PBS) zur Kryoprotektion über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben in OCT (optimal cutting temperature) -Compound-Gel in Blockgefäßen eingebettet, eingefroren und bei -80°C bis zur Anfertigung der Kryoschnitte gelagert. Die OCT-Blöcke wurden bei -20°C in einem Cryotom (Leica) in 5-7 μm dicke Sektionen geschnitten und auf Superfrost-Plus-Glasobjektträger (Fisher) übertragen. Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte bis zur Anwendung von Immunfluoreszenzfärbungen bei -80°C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Analysen

2.4.1 mRNA-Isolation

Für die molekularbiologische Analyse mittels iTaq-SYBR-Green-real-time-RT-PCR musste zunächst die mRNA aus dem Gewebe isoliert werden und danach in cDNA umgeschrieben werden.

RNeasy Mini Procedure

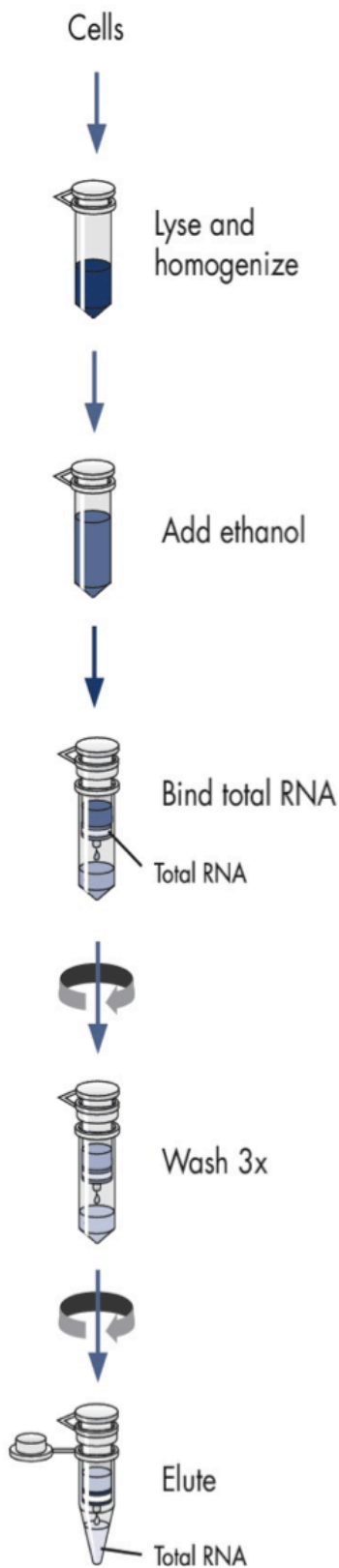


Abbildung 4: Schema der RNA-Isolation (aus dem RNeasy Mini Handbook, 4th Edition, June 2012)

Die mRNA-Extraktion aus der Niere erfolgte mit Qiagen RNeasy MinElute Säulen, entsprechend dem Herstellerprotokoll (siehe Schema in Abbildung 4).

Die gefrorenen Nierenstücke wurden zunächst in 350 μ l Lysepuffer (mit 1 % β -Mercapto-Ethanol) lysiert. Nach Resuspendierung mit 350 μ l 70%igem Ethanol wurde das Lysat in eine Spin-Säule innerhalb eines Collection-Tubes pipettiert und für 30 sec bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der Lyse-Puffer beinhaltet denaturierendes Guanidin-Thiocyanat und hatte neben der Aufspaltung des Gewebes die Aufgabe, RNasen zu inaktivieren, um möglichst intakte RNA zu gewinnen. Die Zugabe von Ethanol ermöglicht die optimale Bindung der Nucleinsäuren an die Silica-Membran der Spin-Säulen. So konnten die Nucleinsäuren an der Membran gebunden werden, während andere Bestandteile des Lysats hindurchgelassen wurden.

Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um restliche, potenziell an die Silica-Membran gebundene DNA zu eliminieren. Dazu wurde zunächst 350 μ l RW1-Puffer in die Spin-Säule gegeben und 30sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 10 μ l DNase und 70 μ l RDD-Puffer vermengt, direkt auf die Säulenmembran pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurde mit 350 μ l RW1-Puffer erneut gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit je 500 μ l RPE-Puffer; beim zweiten Waschen wurde für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss (Kontaminatoren wie Salze, Proteine und verdaute DNA) wurde entsprechend verworfen. Die Säule wurde in ein neues 2 ml-Collection-Tube überführt und zum

Entfernen restlichen Puffers sowie zur Trocknung der Membran für 1 min bei offenem Deckel zentrifugiert.

Zur Elution der RNA wurde die Säule in ein neues steriles Collection-Tube überführt, mit 30 µl RNase-freiem Wasser (65°C) inkubiert und anschließend für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde bis zur RNA-Konzentrationsbestimmung (NanoDrop) zunächst auf Eis und im Verlauf bei -80°C längerfristig gelagert.

2.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese der extrahierten RNA wurde nach Konzentrationsbestimmung entsprechend nach Herstellerprotokoll mit einem iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) durchgeführt.

Dieses enthält eine reverse Transkriptase, welche die Konversion von mRNA in cDNA katalysiert. Als Primer für diese fungieren oligo dT, die mit ihren Thyminbasen komplementär zum poly-A-Schwanz der eukaryontischen mRNA sind. Pro Reaktion wurden 5 µl iScript Reaction Mix mit 1,25 µl reverser Transkriptase und 1 µg RNA in 17,75 µl Nuclease-freiem Wasser eingesetzt. Zuvor wurde die Konzentration und die Reinheit (Absorption 260/280 nm) der eluierten RNA mittels Nano-Drop Spektrophotometer (Thermo Fisher) gemessen und die einzusetzende Menge entsprechend berechnet. Der komplette Reaktionsmix wurde anschließend wie folgt inkubiert: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C.

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.3 Cycle-gradient PCR und quantitative real-time-RT-PCR

Primernamen	Sequenz
α SMA	Sense: 5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA Antisense: 5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
Col 1 α 1	Sense: 5'-GCTCCTCTTAGGGGCCAT Antisense: 5'-CCACGTCTCACCATTGGGG
PDGFR β	Sense: 5'-TTCCAGGAGTGATACCAGCTT Antisense: 5'-AGGGGGCGTGATGACTAGG
TIMP1	Sense: 5'-TGCAACTCGGACCTGGTCATA Antisense: 5'-CGCTGGTATAAGGTGGTCTCG
F4/80	Sense: 5'-TGACTCACCTTGTGGTCCTAA Antisense: 5'-CTTCCCAGAATCCAGTCTTTCC
GFP für qPCR	Sense: 5'-ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA Antisense: 5'-GGCGGATCTTGAAGTTCACC
GAPDH	Sense: 5'-CAATGAATACGGCTACAGCAA Antisense: 5'-AGGGAGATGCTCAGTGTGG

Tabelle 3: Namen und Sequenzen der für die cycle-gradient- und real-time-PCR verwendeten Primer. Die erwarteten Produktgrößen lagen alle bei der für iTaq Universal SYBR Green Supermix empfohlenen Länge von ca. 100 bp.

2.4.3.1 Cycle-gradient PCR

Zur Visualisierung und semiquantitativen Analyse der Genexpression wurde eine Zyklus-Gradienten-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden die Proben zur Evaluation der Genexpression fibrotischer Marker u.a. auf folgende Gene getestet: Col1 α 1, α SMA, GFP, F4/80 und GAPDH. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) fungierte hierbei als Referenz- bzw. so genanntes „housekeeping-Gen“ zur Normalisierung, da es weitestgehend unbeeinflusst durch spezifische Behandlungen gleichmäßig und auf stabilem Niveau exprimiert wird.

Der Reaktionsansatz für die PCR entspricht im Verhältnis dem für die Genotypisierung, mit dem Unterschied, dass hier als Templates je 2,5 μ l einer aus UUO- bzw. CLK-Nierenproben gewonnenen cDNA dienten und das Gesamtvolumen pro Reaktion bei insgesamt 25 μ l lag.

Mastermix	Volumen/Tube	Temperatur	Zeit
H ₂ O	15,25µl	94°C	3:00 min
Puffer Y	2,5 µl	94°C	0:30 min
MgCl ₂	2,5 µl	60°C	1:00 min
dNTPs	1 µl	72°C	1:00 min
Primer fw (20 µM)	0,5 µl	72°C	2:00 min
Primer rev (20 µM)	0,5 µl	4°C	∞
Taq Polymerase	0,25 µl		

Tabelle 4: Schema der Zyklus-Gradienten-PCR. Links: Mastermix-Ansatz für Zyklus-Gradienten-PCR. Rechts: Temperaturprofil des Thermocyclers. Die grün hinterlegten Zellen wurden je n Zyklen wiederholt (n = 20/25/30/35/40).

Die PCR im Thermocycler wurde mit steigenden Zykluszahlen von 20 bis 40 Zyklen in 5er-Schritten durchgeführt. Dazu wurden nach Ablauf der PCR die Proben in aufsteigender Reihenfolge auf ein Agarosegel aufgetragen und verglichen, ab welcher Zykluszahl in UUO und CLK eine eindeutige Bande im Geldoc (Vilber Lourmat) bei automatischer Belichtungszeit zu erkennen war. Hierbei bedeutete: Je niedriger die Zykluszahl, bei der eine PCR-Bande detektierbar war, umso höher war die im Template enthaltene cDNA-Konzentration und damit Transkription/Expression des untersuchten Zielgens.

2.4.3.2 Quantitative real-time-RT-PCR

Bei der real-time-RT-PCR handelt es sich um eine PCR, die neben dem qualitativen Nachweis von Nukleinsäuren in Echtzeit auch eine semi-quantitative Bestimmung und damit indirekt eine mRNA-Expressions-Analyse ermöglicht.

Für die Quantifizierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzt, welcher mit der amplifizierten DNA interkaliert. Der resultierende DNA-Farbstoff-Komplex

absorbiert Licht bei einer Wellenlänge λ_{\max} von 494 nm (blau) und emittiert Licht bei λ_{\max} von 521 nm (grün) (siehe iQ SYBR Green Supermix Manual, Bio-Rad 2009).

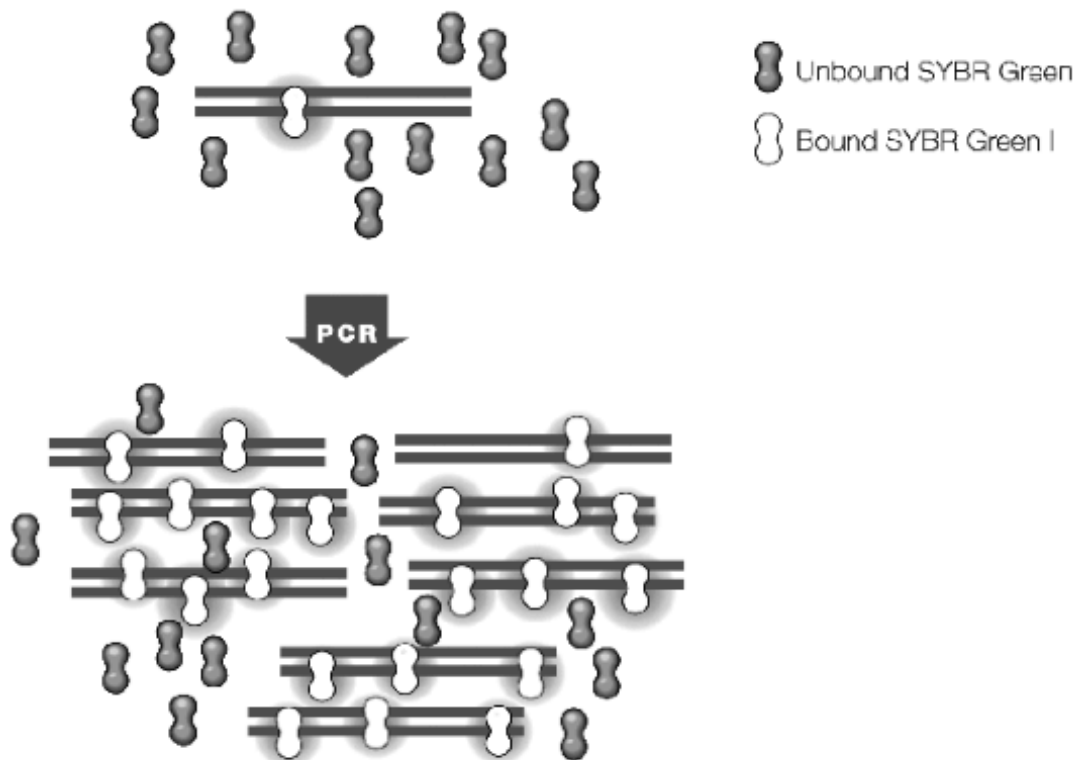


Abbildung 5: SYBR Green-Bindung in einer real-time PCR. SYBR Green interkaliert mit doppelsträngiger DNA. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max} = 521$ nm. (aus: iQ SYBR Green Supermix Manual, Bio-Rad 2009)

Die Detektion der Amplifikate erfolgt jedoch, anders als bei einer „herkömmlichen“ PCR, nicht am Ende auf einem Agarosegel, sondern während jedes einzelnen Zyklus, d. h. in Echtzeit, per Erfassung der Fluoreszenzintensität. So kann der Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit verfolgt werden.

Die mit zunehmender Zahl der PCR-Zyklen steigende Fluoreszenz lässt sich in drei Phasen einteilen: Die erste Phase ist charakterisiert durch die geringe Templatemenge; dadurch treffen Template, Primer und Polymerase nur selten aufeinander, und es gibt wenig dsDNA, mit welcher der Farbstoff interkalieren und sich von der Hintergrundfluoreszenz abheben könnte. In der zweiten Phase steigt die Produktmenge und in Korrelation dazu die Fluoreszenz über dem Hintergrund exponentiell an. Während der dritten Phase findet dann eine Aufsättigung des Probengefäßes mit Produkten und auch unspezifischen Fragmenten statt, und die Fluoreszenz bleibt konstant.

Um sicherzustellen, dass bei diesem Verfahren der exponentielle Anstieg der Fluoreszenz nicht durch unspezifische Fragmente wie z. B. Primer-Dimere ausgelöst wird, wurde im Anschluss an die PCR eine so genannte Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird

die Probe durch schrittweise Erhöhung der Temperatur (50°C-95°C) „aufgeschmolzen“ und dabei die Veränderung der Fluoreszenz registriert. Da die Schmelztemperatur und -kurve wesentlich von der Länge und Basenzusammensetzung des DNA-Fragments abhängen, wird so durch die gewonnenen Daten auf die Spezifität der PCR-Reaktion geschlossen. So haben z. B. unspezifische Primer-Dimere eine erheblich geringere Schmelztemperatur als lange DNA-Doppelstränge.

Mit Hilfe eines Referenzgens, dessen Expression bei Veränderungen des Zellstoffwechsels (d. h. während eines Experiments) weitestgehend unberührt bleiben sollte, kann über die Fluoreszenz bzw. Zykluszahl indirekt auf das Expressionsniveau eines Gens geschlossen werden.

Nach Festlegung der zu verwendenden Primer (siehe Tabelle 3 & 4) und der endogenen Kontrolle (GAPDH) wurde für jedes Primerpaar ein Mastermix angefertigt. Für GAPDH wurden zur genaueren Bestimmung der Referenz Duplets angesetzt. Je Reaktion wurden 1 µl Template, je 0,12 µl des Sense- und Antisense-Primers (je 20 µM Konzentration; Tab. 4), 10 µl des iTaq Universal SYBR Green Supermix und 8,86 µl H₂O verwendet (Gesamtvolumen 20 µl). Für die Messung wurden die Proben entsprechend in Duplicates oder Triplicates in einer 96 well plate pipettiert. Als Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA H₂O verwendet. Im Cycler erfolgte anschließend die Erhitzung auf 95°C für 3 min (Denaturierung der dsDNA und Aktivierung der Polymerase). Es folgte die Amplifikation des Template über 40 Zyklen von zuerst 95°C (Denaturierung) für 15 sec, gefolgt von 60°C (Primeranlagerung und Elongation) für 1 min. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die Fluoreszenzintensität des DNA-interkalierenden SYBR-greens detektiert.

Die Auswertung der Genexpression erfolgte anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, die eine relative Quantifizierung erlaubt. Dazu wurde mittels der Applied-Biosystems-Software des PCR-Geräts zunächst für jede Reaktion ein Schwellenwert ($\text{Ct} = \text{cycle of threshold} = \text{Schwellenzyklus}$) bestimmt. Der Ct-Wert ist als der Schwellenwert definiert, an dem sich die detektierte Fluoreszenz messbar vom Hintergrund abhebt, d. h. die PCR-Reaktion in die exponentielle Phase übergeht. Zur Quantifizierung der relativen Genexpression wurde die Differenz (ΔCt) vom Mittelwert des jeweiligen Ct-Wertes, z. B. von GFP, zum Mittelwert des Ct-Wertes der GAPDH derselben Probe berechnet: $\text{Ct}_{\text{GFP}} - \text{Ct}_{\text{GAPDHmittel}} = \Delta\text{Ct}$. Die Veränderung der Genexpression, also der Vergleich von UUO- und CLK-Proben, d. h. geschädigter und ungeschädigter Niere, wurde durch den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ermittelt. Dazu wurde der Ct-Wert der Kontrolle vom Ct-Wert der zu vergleichenden Probe abgezogen: $\Delta\text{Ct}_{\text{CLK}} - \Delta\text{Ct}_{\text{UUO}} = \Delta\Delta\text{Ct}$. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/-

Standardabweichung angegeben. Die mittleren Ct-Werte der zu vergleichenden Gruppen (UUO vs. CLK) wurden mittels ungepaartem t-Test verglichen und *P*-Werte < 0,05 als signifikant betrachtet.

2.5 Nachweis der Proteinexpression mittels Western Blot

Da der molekularbiologische Nachweis einer verstärkt exprimierten mRNA nicht zwangsläufig bedeutet, dass am Ende auch wirklich mehr Protein translatiert wird (Ingolia et al., 2009), wurden zur Validierung auf Proteinebene Proteinlysate aus den Nieren hergestellt und die Proteinexpression im Western Blot mittels spezifischer Antikörper untersucht.

In Flüssigstickstoff schockgefrorene, bei -80°C gelagerte Nierenstücke wurden in 200 µl eiskaltem Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer (50mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % Desoxycholsäure, 1 % Igepal bei einem pH von 7) unter Zugabe von 1 % Protease-Inhibitor mittels Ultraschallhomogenisator homogenisiert und für 30 min bei 13000 RPM und 4°C zentrifugiert.

Als Positivkontrolle dienten Proteinextrakte von Schwanzspitzen der etablierten eGFP-L10a-exprimierenden Coll1α1-eGFP-L10a-Linie (Grgic et al., 2014b). Als Negativkontrolle fungierten Nierenlysate von Wildtyp-Tieren.

Anschließend erfolgte die Messung der Proteinkonzentration mit dem Microplate BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Herstellerangaben. Hierbei wird eine Standardreihe aufsteigender Konzentrationen (125-2000 µg/ml) von bovinem Serum-Albumin (BSA) erstellt, anhand derer die Konzentration der Probe bei guter Standardreihe zuverlässig bestimmt werden kann. Der Vorteil im Vergleich zum Bradford Protein Assay liegt in der geringeren Anfälligkeit gegenüber reduzierenden Reagenzien, die z. B. im Lysepuffer vorhanden sein können. Nach Messung der Gesamtproteinkonzentration wurde anhand der Probe mit der niedrigsten Konzentration die Auftragsmenge der anderen Proben für die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) angepasst. Diese lag bei 206 µg. Für die Kontrollen fiel die Ausbeute geringer aus, sodass dort nur 15 µg pro Tasche des Polyacrylamidgels eingesetzt werden konnten.

Nach Auftrag der Proben auf die Gele (es wurde ein doppelter Ansatz durchgeführt) folgte die elektrophoretische Auftrennung und im Anschluss daran der Transfer der aufgetrennten Proteinfractionen auf eine Nitrocellulosemembran. Um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren, wurde die Membran danach 1 Std bei

Raumtemperatur in 5 % fettfreiem Milchpulver, das in TBS/T (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 bei pH 7,5) gelöst war, inkubiert.

Zum spezifischen Nachweis des eGFP-L10a-Transgens wurde der ebenfalls für die Immunfluoreszenzfärbung angewandte Chicken-anti-GFP-Antikörper (Aves) verwendet. Die Hälfte der Membranen wurde mit diesem Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 über Nacht bei 4°C inkubiert. Um sicherzustellen, dass die Auftragsmenge wirklich gleich war, wurde die andere Hälfte der Membranen mit einem Rabbit-anti-GAPDH-Antikörper (Bethyl Labs) ebenfalls in einer Verdünnung von 1:2000 über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen je 3x je 10 min in TBS/T auf einer Schwenkplatte gewaschen und im Anschluss eine Stunde mit HRP (horseradish peroxidase) -konjugiertem goat-anti-chicken- bzw. goat-anti-rabbit-Antiserum bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBS/T folgte die Detektion der antikörpermarkierten Proteine durch Auftragen einer enhanced chemiluminescent (ECL) -Lösung (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate) durch ein Fusion FX (Vilber) UV-Detektorsystem. ECL fungiert dabei als Substrat für die Peroxidase, so dass die markierten Proteine unter UV-Licht detektierbar werden.

Die erwarteten Größen der Proteine lagen für GAPDH bei ca. 35 kDa und für das eGFP-L10a-Konstrukt bei ca. 50 kDa (kombinierte Molekülgröße aus eGFP und L10a). Zur Sicherung der Ergebnisse wurden die Membranen, die zuvor gegen GAPDH gefärbt worden waren, nun noch gegen eGFP (-L10a) getestet und umgekehrt.

2.6 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Validierung und Überprüfung der zelltypspezifischen Expression des Transgens wurden Immunfluoreszenzfärbungen in Nierengewebe der neu generierten Mac^{TRAP}-Mäuse durchgeführt.

Hierbei wurde ein anti-GFP-Antikörper verwendet, um das endogene eGFP-L10a-Signal, welches erwartungsgemäß in den Mac^{TRAP}-Makrophagen exprimiert wird, zur erleichterten optischen Detektion zusätzlich zu verstärken. Zur genaueren Charakterisierung der eGFP-L10a-positiven Zellpopulation wurde zusätzlich mit folgenden Antikörpern gefärbt: F4/80 (Oberflächenmarker für Makrophagen), CD3 (Lymphozyten-Marker), CD31/PECAM (Platelet endothelial cell adhesion molecule, Marker für Gefäßendothel), α SMA (alpha smooth muscle actin, Marker für

Myofibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen) und CD140b/PDGFR β (Platelet derived growth factor receptor beta, Marker für mesangiale glomeruläre Zellen und Perizyten/Fibroblasten (Grgic et al., 2014b)).

Die mit Kryo-Schnitten beladenen Objektträger wurden kurz in der Dunkelkammer bei Raumtemperatur getrocknet und danach für fünf Minuten in PBS gewaschen (Rüttelplatte 50 rpm). Das Gewebe wurde mit einem wasserabweisenden Fettstift für die Inkubationen eingerahmt. Zur Verstärkung des intrazellulären eGFP-L10a-Signals wurde zur Permeabilisierung der Zellmembranen das Gewebe für 8 min mit 0,1 % Triton X-100 inkubiert und danach 3 x 3 min lang mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 10%igem NGS (Normal Goat Serum) für 30 min in einer verdunkelten Feuchtkammer geblockt.

Es folgte die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer mit dem jeweiligen primären Antikörper, entsprechend anti-GFP (chicken) und einem weiteren Antikörper (gegen zelltypspezifische Marker) pro Nierengewebschnitt. Die eingesetzten Konzentrationen (in 2 % NGS) der primären Antikörper sind in Tabelle 5 dargestellt.

Marker	Spezies	Verdünnung
GFP	Huhn	1:250
F4/80	Ratte	1:1000
CD3	Kaninchen	1:300
CD31/PECAM	Ratte	1:600
CD140b/PDGFR β	Ratte	1:800
α SMA	Maus, direkt Cy3-gekoppelt	1:2500

Tabelle 5: Spezies und Verdünnungen der verwendeten primären Antikörper.

Nach Absaugen des primären Antikörpers wurde 3 x für 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern gegengefärbt. Dabei handelte es sich um einen FITC-gekoppelten anti-Chicken-IgG-Antikörper (grüne Fluoreszenz) sowie Cy3-gekoppelte IgG-Antikörper (rote Fluoreszenz) gegen die jeweilige Spezies des verwendeten primären Antikörpers. Beide sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Nach 30 min Inkubation in der dunklen Feuchtkammer wurde erneut 3x gewaschen. Nach dem vollständigen Trocknen des Objektträgers wurden die Schnitte mittels ProLongGold-Anti-Fade-DAPI für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet und gleichzeitig die Zellkerne „angefärbt“. Die

Schnitte wurden direkt im Anschluss an die Färbung mit einem Axio Observer Z1 Mikroskop mit Apotom (Zeiss) mikroskopiert.

3 Ergebnisse

3.1 Biometrische Analysen

3.1.1 Wachstumsbeobachtung

Im Zuchtverhalten wurden bei Mac^{TRAP}-Tieren keine makroskopischen Auffälligkeiten festgestellt. Fehlbildungen traten im Vergleich zu cfms-eGFP-L10a-negativen Mäusen nicht überproportional häufig auf. Die Anzahl der Nachkommen betrug im Durchschnitt $5,59 \pm 2,83$ pro Wurf ($n = 17$ Würfe). Die Wachstumsentwicklung von 4 longitudinal nachverfolgten repräsentativen Würfen (insgesamt 18 Männchen und 18 Weibchen) wird in Abb. 6 dargestellt.

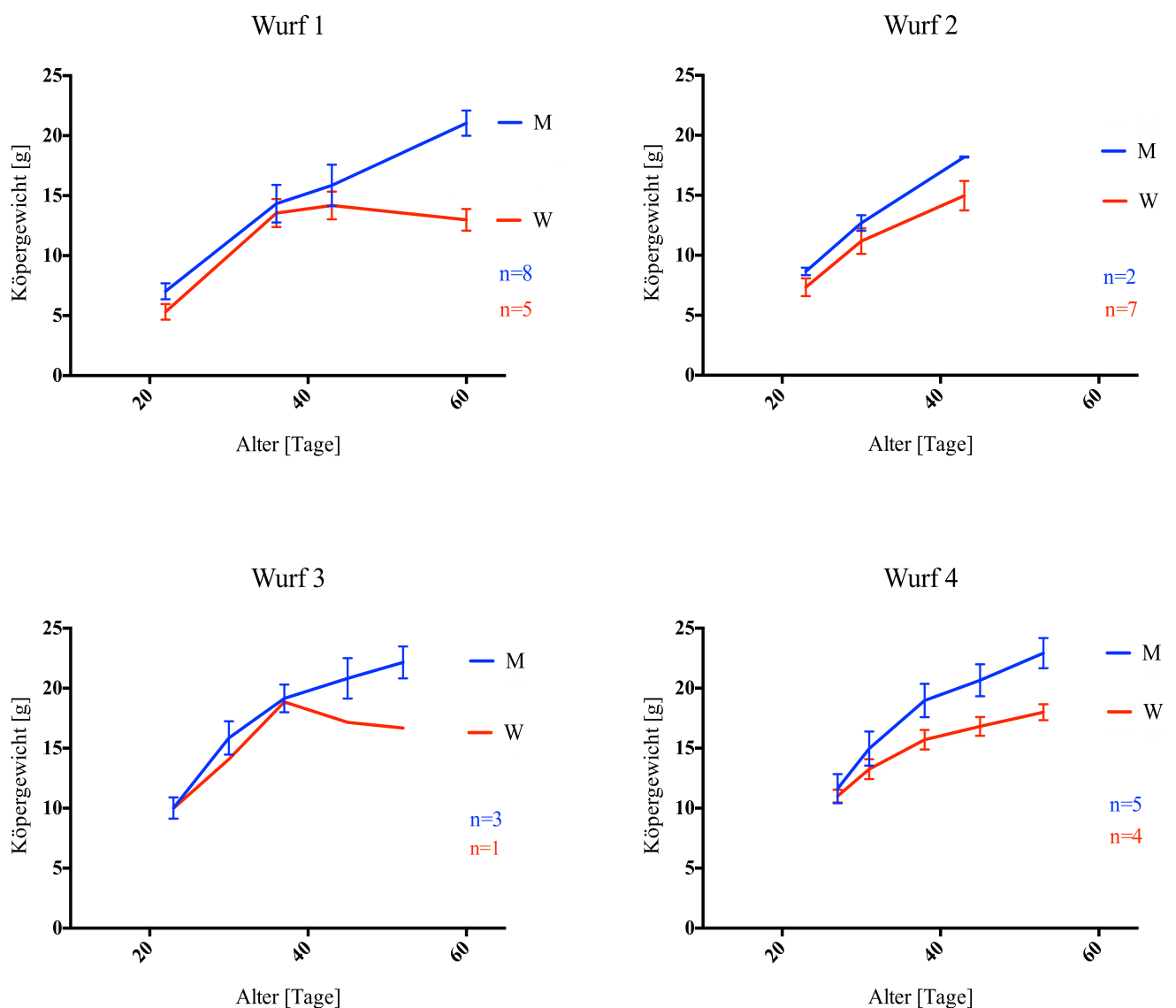


Abbildung 6: Wachstumsverlauf der Mac^{TRAP}-Linie. Gewogen wurden 18 Männchen (blau) und 18 Weibchen (rot) im Alter von ca. 20 bis 60 Tagen.

Zum Vergleich wurden die Angaben des Jackson Laboratory zu den beiden Linien, aus denen sich der genetische Hintergrund der Mac^{TRAP}-Linie zusammensetzt, herangezogen (Abb. 7,8).

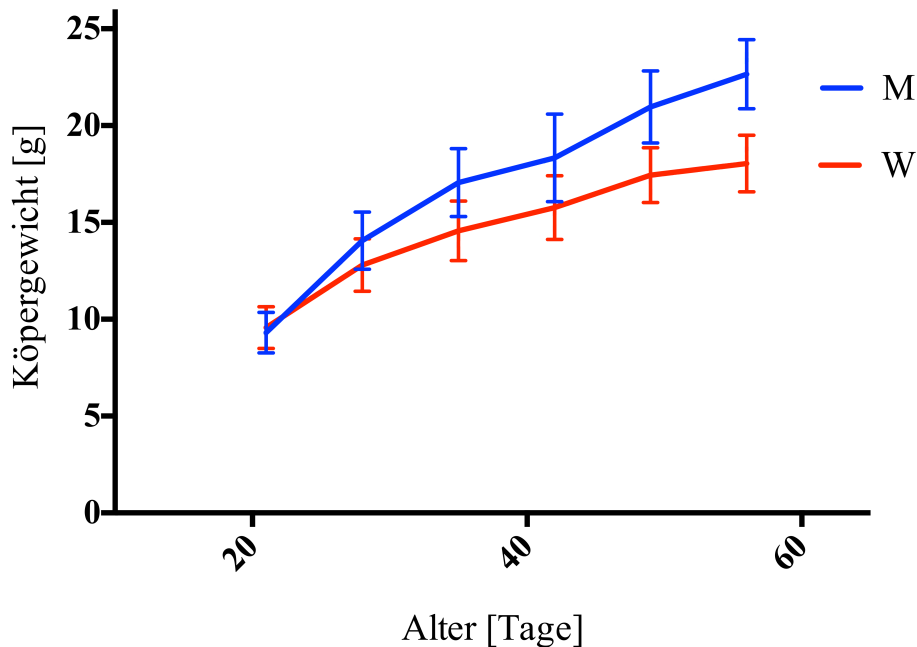


Abbildung 7: Wachstumskurve der DBA/2J-Linie, erstellt aus den Daten des Jackson Lab. Gezeigt wird der relevante Bereich von drei bis ca. 10 Wochen. Quelle: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000671> (letzter Zugriff am 11.02.2023)

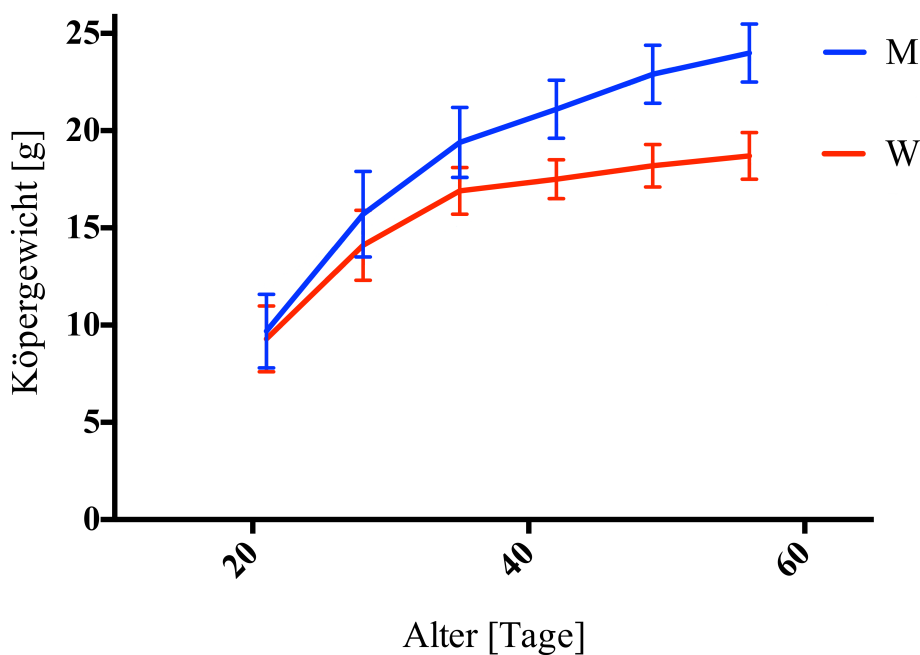


Abbildung 8: Wachstumskurve der C57BL/6J-Linie, erstellt aus den Daten des Jackson Lab. Gezeigt wird der relevante Bereich von drei bis ca. 10 Wochen. Quelle: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664> (letzter Zugriff am 11.02.2023)

3.1.2 Organgrößenvergleich und makroskopische Untersuchung

Um auszuschließen, dass es bei der neu generierten Mac^{TRAP}-Linie aufgrund der Transgeninsertion zu unerwarteten anatomischen und morphologischen Auffälligkeiten kommt, wurden verschiedene Organe aus 6 Monate alten Tieren extrahiert, gewogen und mit entsprechenden WT-Tieren vergleichbaren backgrounds, allerdings gemäß Angaben etwas jüngeren Alters, verglichen (n = 10 pro Geschlecht und Genotyp, Abb. 12). Es zeigte sich bei Nieren und Milz der Mac^{TRAP}-Tiere ein signifikanter Unterschied im Organgewicht gegenüber dem Wildtyp. Grobmorphologische Abnormitäten ergaben sich nicht.

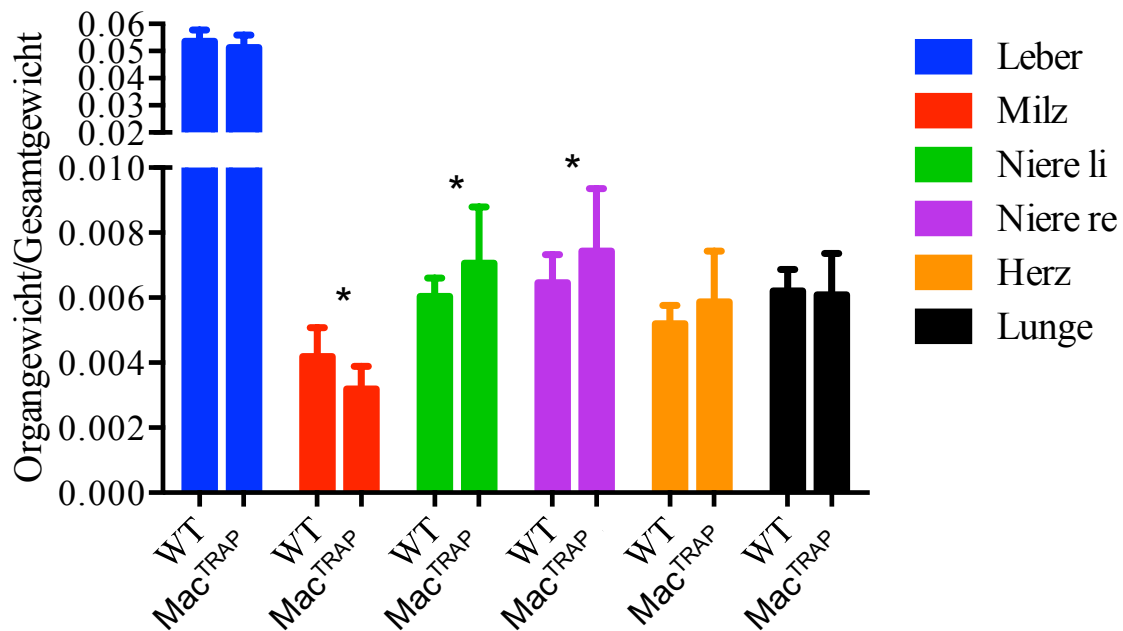


Abbildung 9: Vergleich von Mittelwert und Standardabweichung des Gewichts verschiedener Organe von Wildtyp (WT) und Mac^{TRAP}-Mäusen, normiert auf das Körpergewicht. Entnommene Organe stammten aus je 10 Männchen und Weibchen desselben Genotyps. * = p < 0.05

Im Folgenden sind Aufnahmen der Organe von Mac^{TRAP}-Tieren im Vergleich mit denen des Wildtyps im Sinne einer exemplarischen Organschau gezeigt (Abb.10).

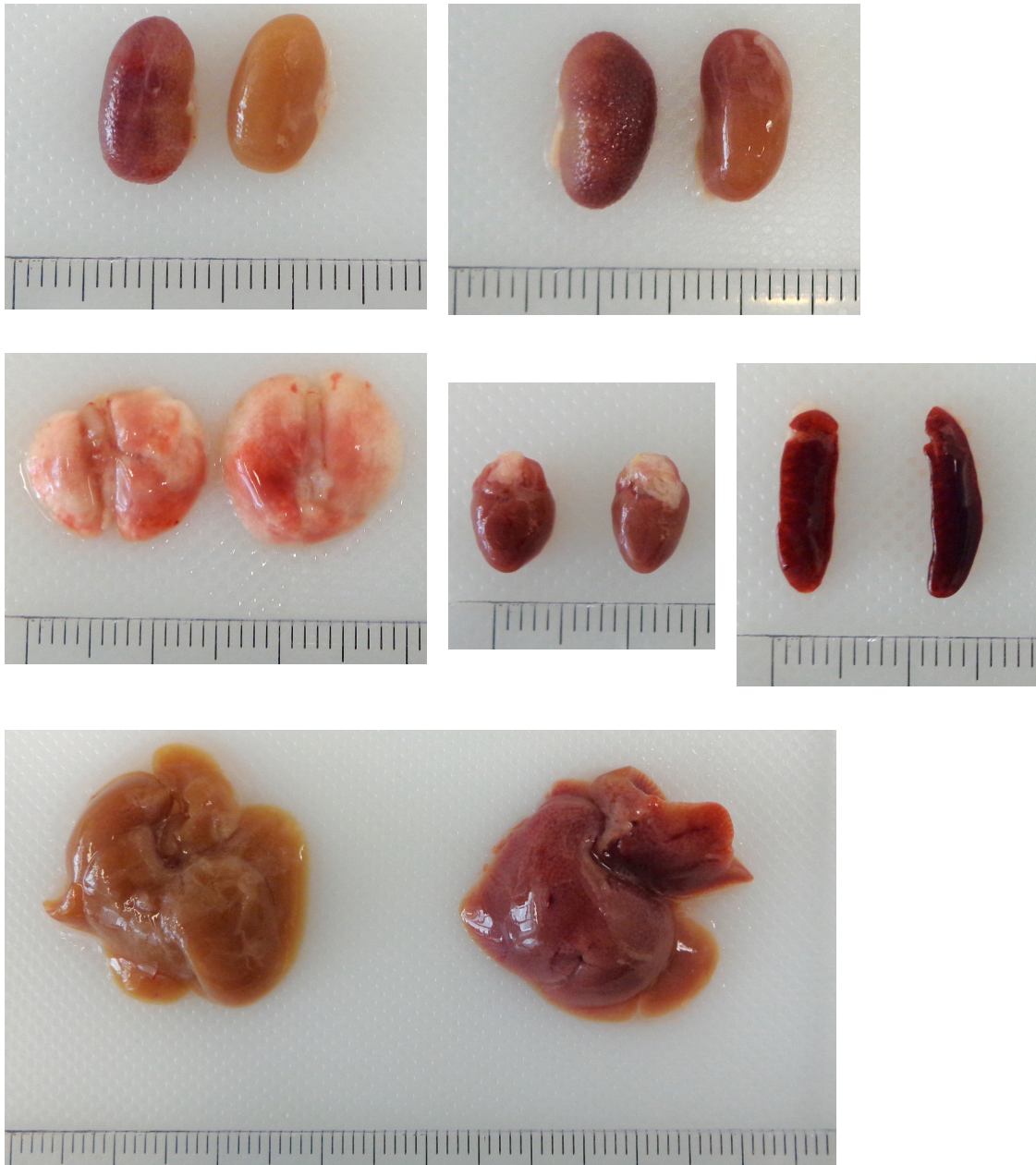


Abbildung 10: Organschau eines Wildtyp-Tiers (jeweils links) und eines für das Transgen positiven Mac^{TRAP}-Tiers (jeweils rechts). Von links oben nach rechts unten: linke Niere, rechte Niere, Lunge, Herz, Milz, Lunge, Leber.

3.2 Molekularbiologische Analysen

3.2.1 Qualitativer Nachweis der Transgenexpression und -induzierbarkeit

Um die Transgenexpression sowie deren Induzierbarkeit in Mac^{TRAP}-Mäusen zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA aus UUO- und CLK-Nieren extrahiert, diese mittels einer reversen Transkriptase in cDNA konvertiert und einer Zyklus-Gradienten-PCR nach zuvor beschriebenem Schema unterzogen. Hier diente die GAPDH-Expression als Referenz.

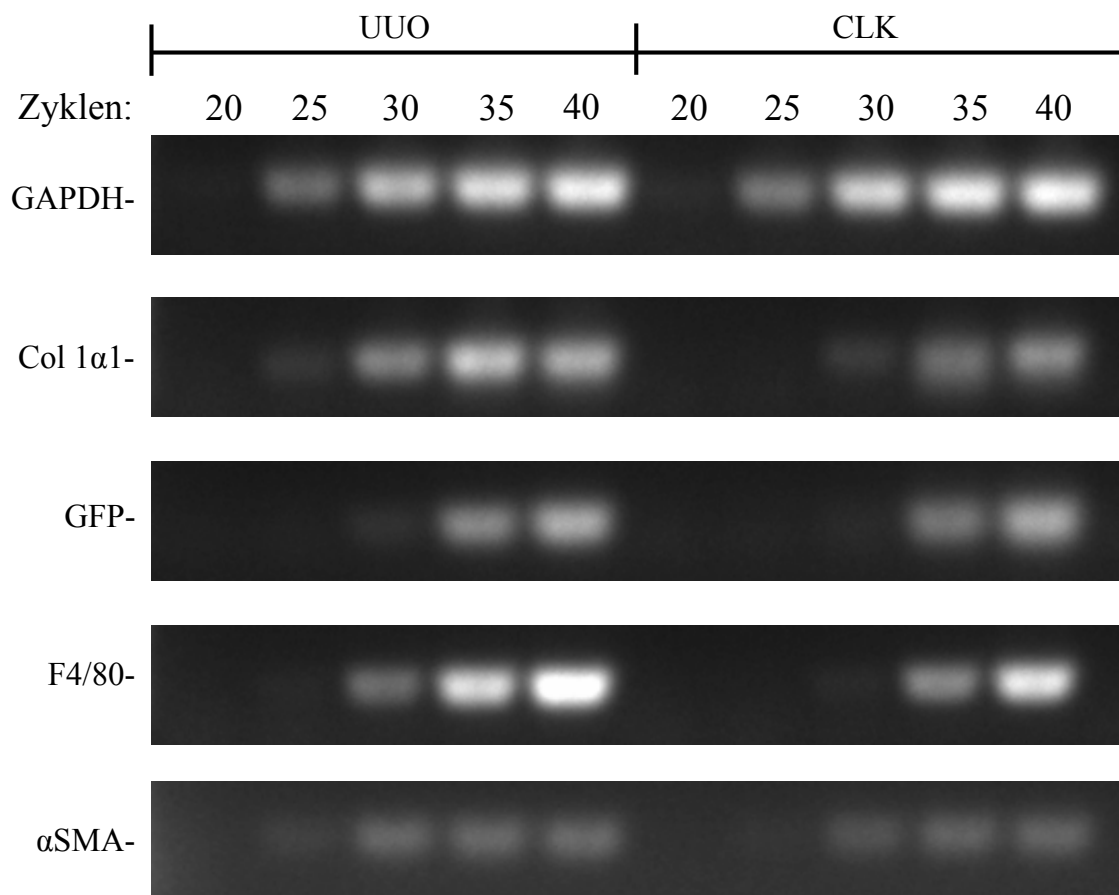


Abbildung 11: Cycle-gradient PCR, Gegenüberstellung von UUO (links) und CLK (rechts). GAPDH fungiert hier als Referenzgen: die Bandenintensität zwischen UUO und CLK ist vergleichbar, sodass von annähernd gleicher Auftragsmenge ausgegangen wird. Neben eGFP-L10a wurden als Fibrosemarker bekannte Gene (α SMA, Col1 α 1) sowie der Makrophagenmarker F4/80 aufgetragen.

Abbildung 11 zeigt, dass die Expression von Fibrose-Markern wie Collagen 1 α 1 und α SMA in der fibrosierenden UUO-Probe ca. 5 bis 10 Zyklen früher sichtbar wird als in der ungeschädigten CLK-Probe. Dies lässt sich als Hinweis interpretieren, dass das UUO-Manöver erfolgreich war und eine signifikante Nierenfibrose induziert wurde.

Der deutlich sichtbare Anstieg der F4/80 Expression in UUO im Vergleich zu CLK spricht für eine Zunahme der Präsenz von Makrophagen zum Zeitpunkt der Organentnahme. Die eGFP-L10a-Bande lässt ebenfalls eine diskrete Expressionszunahme des Transgens vermuten.

Zusammengenommen untermauern diese Daten, dass eGFP-L10a in der Niere der Mac^{TRAP}-Maus exprimiert wird und durch UUO weiter induziert werden kann.

3.2.2 Quantitativer Nachweis der Transgenexpression und -induzierbarkeit

Zur Verifizierung und Präzisierung der Ergebnisse der cycle-gradient-PCR verwendeten wir des Weiteren die quantitative real-time-RT-PCR (im weiteren qPCR genannt). Mit dieser lassen sich genauere Aussagen über das Ausmaß der Genexpressionsveränderungen nach UUO-Manöver treffen.

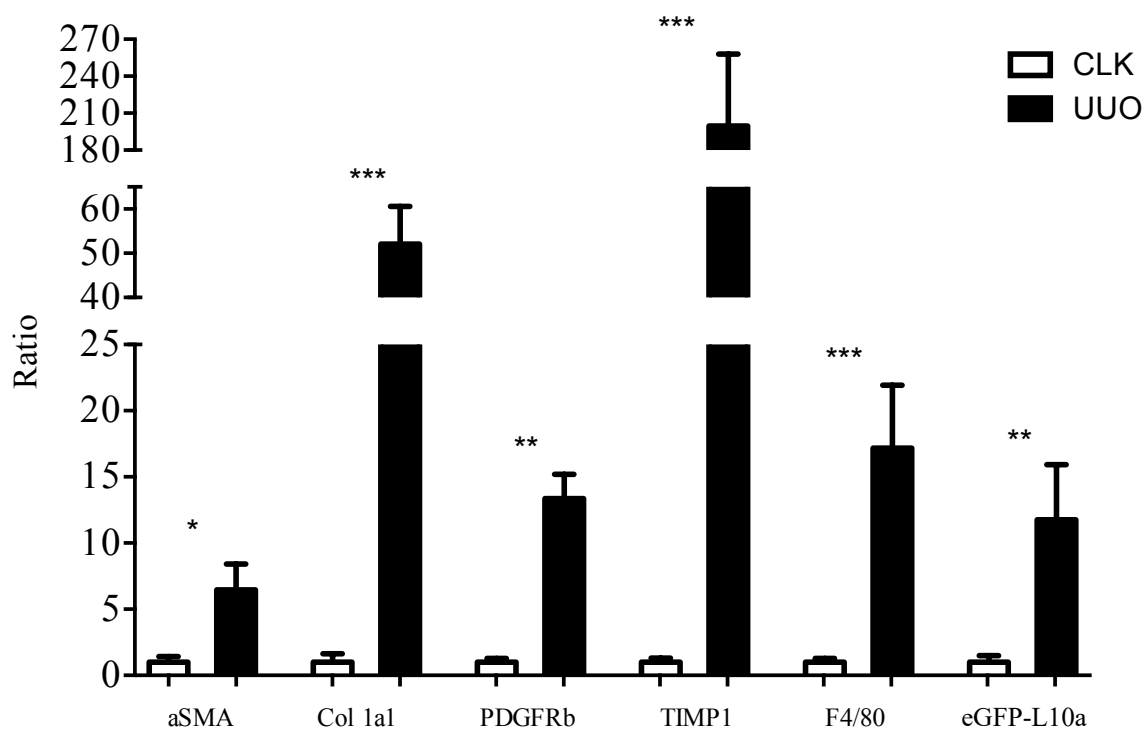


Abbildung 12: Veränderung der Genexpression von Fibrosemarkern, F4/80 und eGFP-L10a nach 7 d UUO (schwarze Balken) im Vergleich zur CLK-Kontrolle (weiße Balken). Gezeigt sind die $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Werte, normiert auf CLK. n = 5; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,0001

Es zeigte sich für alle getesteten Gene eine signifikant gesteigerte Expression in den UUO-Proben. Hervorzuheben ist hier die über 200fach gesteigerte Expression des Fibrose-Markers TIMP1.

Die Expression von F4/80 stieg um das 17fache, was für eine gesteigerte Präsenz von Makrophagen im geschädigten Gewebe spricht. Die eGFP-L10a-Expression war um circa den Faktor 10 gesteigert. Die Ergebnisse stehen somit in gutem Einklang mit den orientierenden Ergebnissen der cycle-gradient-PCR.

3.3 Nachweis auf Proteinebene

Nachdem mittels qPCR ein molekularbiologischer Nachweis einer verstärkten eGFP-L10a Expression in erkrankten Nieren der Mac^{TRAP}-Maus auf RNA-Ebene erbracht wurde, sollte im nächsten Schritt ein Nachweis des Transgens auf Proteinebene erfolgen. So soll gezeigt werden, dass die transgene mRNA im Mausorganismus auch tatsächlich in das Fusionsprotein translatiert wird.

Im Western Blot ließen sich in Proteinlysaten der CLK-Proben keine eindeutigen Banden auf der zu erwartenden Höhe bzw. Größe von ca. 50 kDa per anti-GFP blotting detektieren. Die UUO-Proben ließen dagegen eine deutliche Bande erkennen. Als Positivkontrolle diente Proteinlysate eines Schwanzstücks der Col1 α 1-eGFP-L10a-Maus (Grgic et al., 2014b), die bekanntermaßen ein hohes Maß an eGFP-L10a-Expression aufweist. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das fibroseinduzierende UUO-Manöver in einer gesteigerten Produktion des Fusionsproteins eGFP-L10a in Mac^{TRAP}-Nieren resultiert.

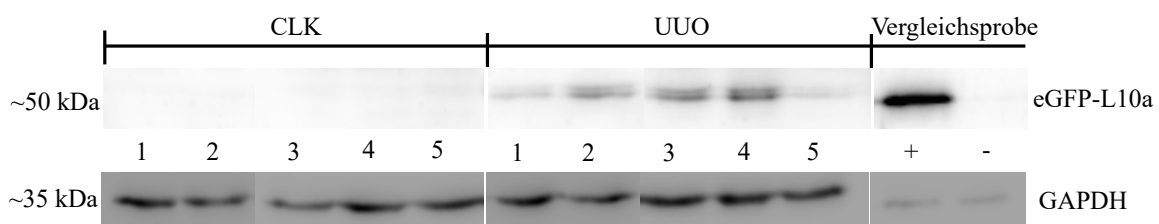


Abbildung 13: Western Blot mit Nachweis einer gesteigerten eGFP-L10a-Expression in Nierenlysaten von Mac^{TRAP}-Tieren nach 7 d UUO im Vergleich zu CLK-Kontrollen. Die unteren Banden bei 35 kDa repräsentieren GAPDH; gleiche Protein-Auftragsmenge für Nierenproben (CLK/UUO), deutlich geringere für Positivkontrolle (Schwanzstück einer Col1 α 1-L10a-Maus). Als Negativkontrolle wurde Nierenlysate von Wildtyp-Tieren verwendet. Banden auf der Höhe des eGFP-L10a Fusionsproteins (~50kDa) sind in den UUO-Nierenproben deutlich sichtbar. In den CLK-Proben ist hingegen nur eine schwache Bande detektierbar.

3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Durch Anwendung immunhistologischer Methoden sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob es möglich wäre, die faktische Expression des eGFP-L10a-Transgen einem definierten Zelltyp visuell zuzuordnen. Dazu wurden einige Bestätigungs- und Ausschlussfärbungen durchgeführt. Im Folgenden werden repräsentative Bildausschnitte der durchgeführten Färbungen (Abb.17-21) sowie die Ergebnisse der Auszählungen (Abb. 22-23) gezeigt. Die dargestellten Beispielbilder zeigen für eGFP-L10a-positive Zellen ein akzentuiert perinukleäres Signal, passend zu der erwarteten Lokalisation des L10a-Proteins in Ribosomen und der überwiegenden Assoziation mit dem endoplasmatischen Retikulum (Heiman et al., 2008).

Zusammenfassend ließ sich aus den Kolokalisationsanalysen feststellen, dass die gefundenen eGFP-L10a-positiven Zellen größtenteils auch positiv für den Makrophagenmarker F4/80 waren. Im Gegensatz dazu waren sie größtenteils oder gänzlich negativ für die Marker CD3 (Lymphozyten), CD31 (Gefäßendothel) sowie PDGFR β (Perizyten, perivaskuläre Fibroblasten) und α SMA (Myofibroblasten, glatte Gefäßmuskelnzellen), so dass für letztere keine signifikanten Kolokalisationen in den Färbungen gefunden werden konnten.

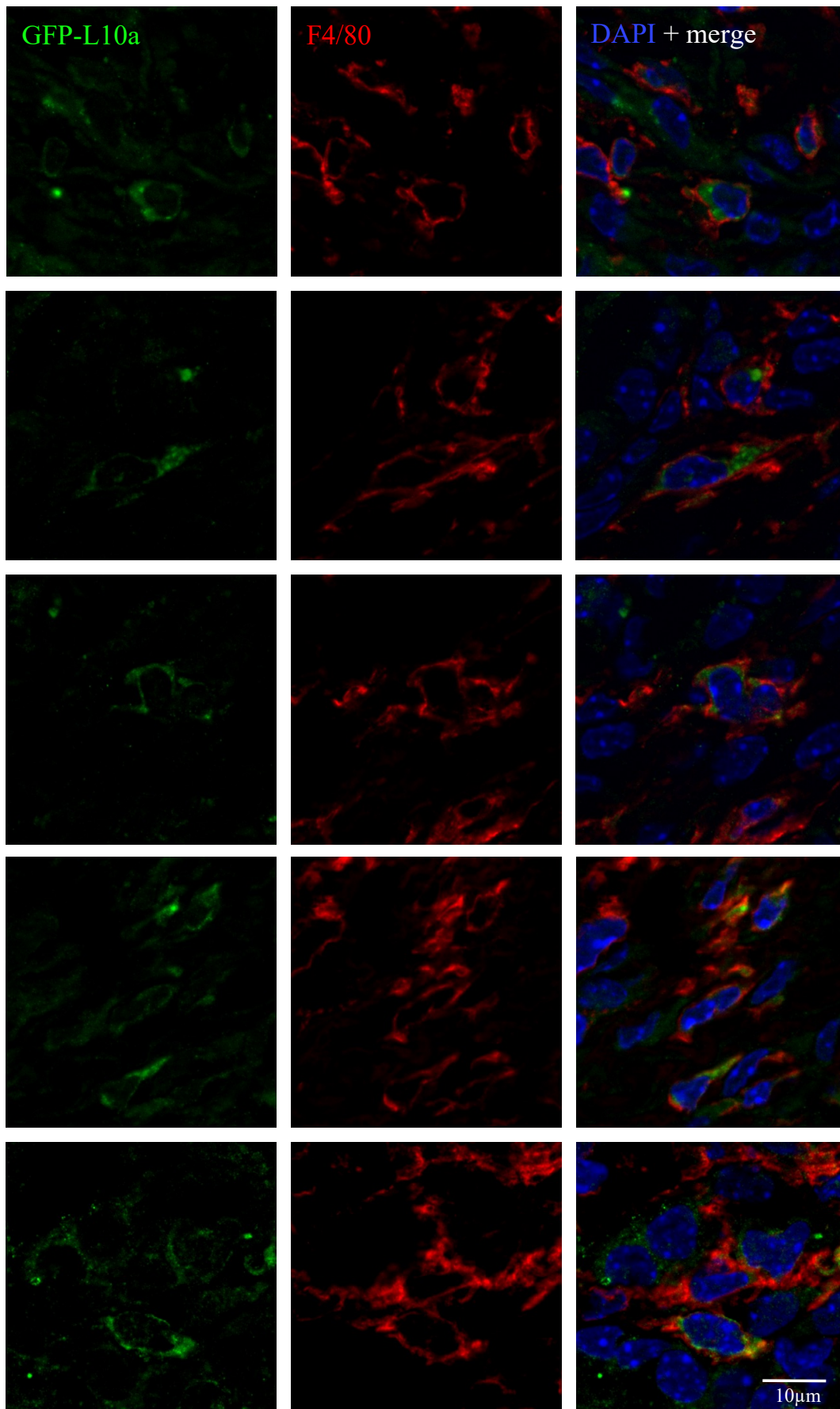


Abbildung 14: EGFP-L10a + F4/80-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe. EGFP-L10a (grün), F4/80 (rot). Das eGFP-L10a-Signal weist eine perinukleäre Lokalisation auf. F4/80 findet sich vorwiegend membranär. Es zeigt sich eine hochsignifikante Ko-Färbung von eGFP-L10a und F4/80-positiven Zellen. Nicht für alle F4/80-positiven Zellen ließ sich gleichzeitig eine prompt distinguierbare Transgenexpression mit dieser Analysemerkmale feststellen.

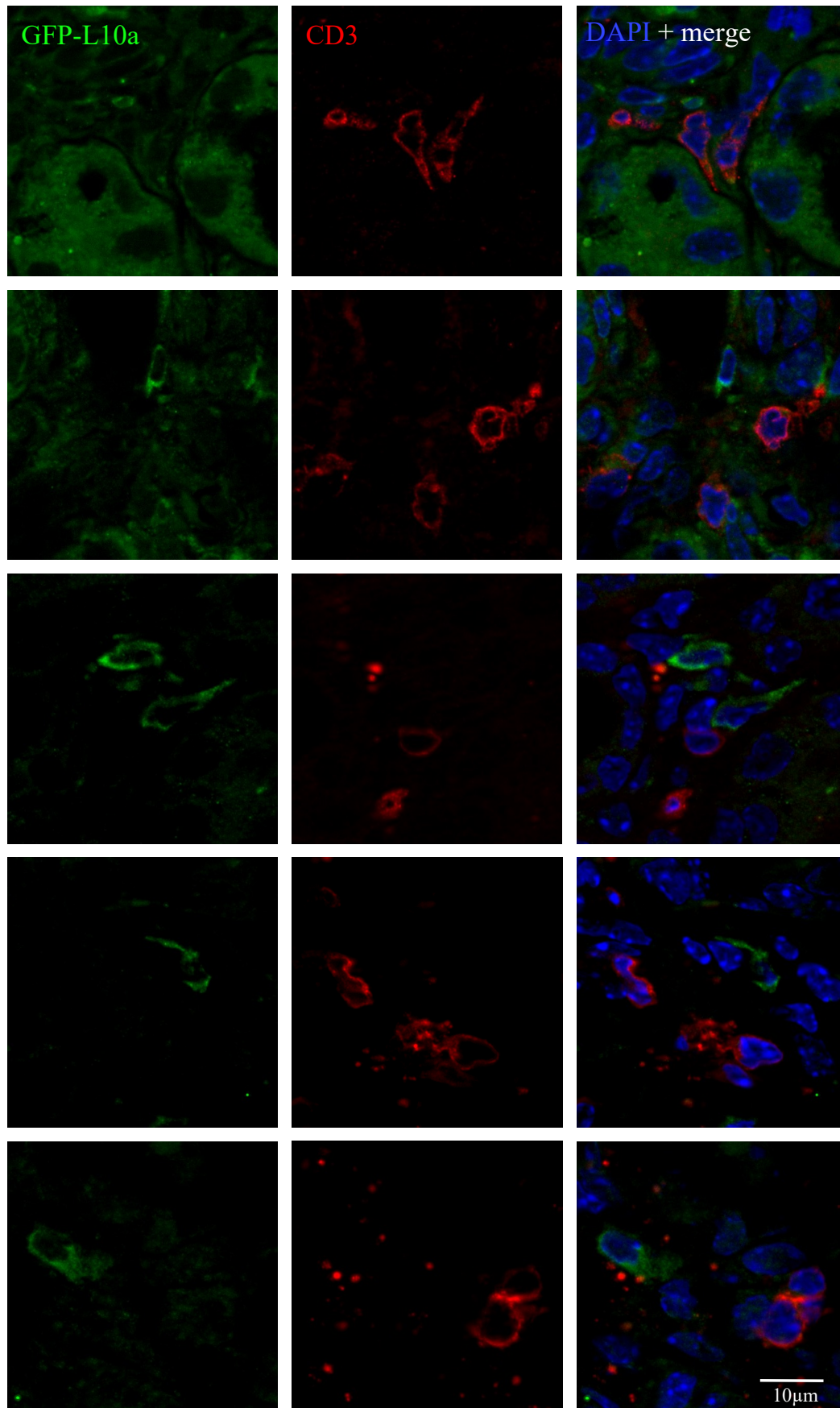


Abbildung 15: EGFP-L10a + CD3-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe. EGFP-L10a (grün), CD3 (rot). Das eGFP-L10a-Signal ist perinukleär lokalisiert. CD3 findet sich vorwiegend membranär. Eine Ko-Färbung von Zellen positiv für den Lymphozytenmarker CD3 und eGFP-L10a-positiven Zellen war nicht nachweisbar.

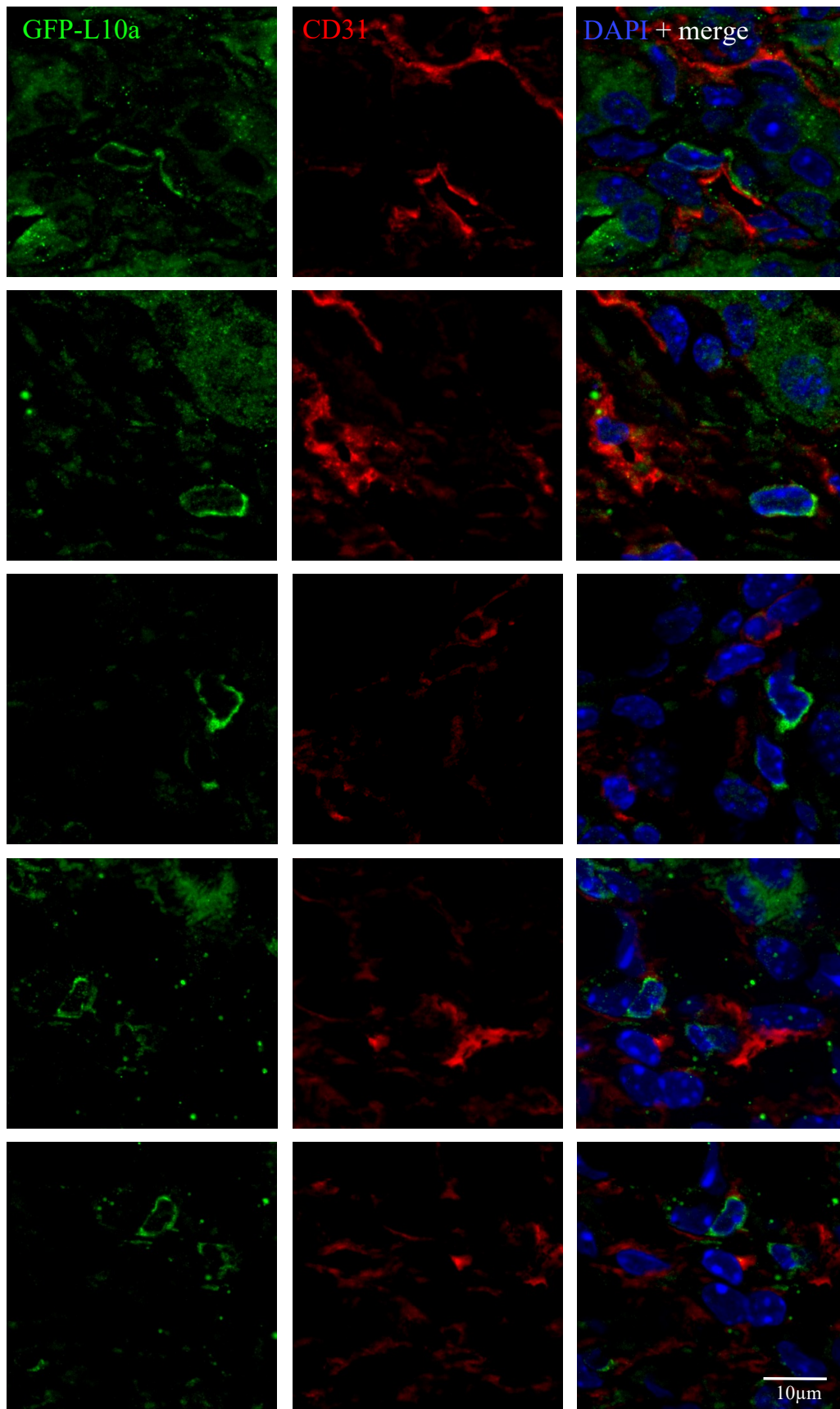


Abbildung 16: EGFP-L10a + CD31-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe. EGFP-L10a (grün), CD31 (rot). Das eGFP-L10a-Signal ist perinukleär lokalisiert. CD31 findet sich vorwiegend membranär an der Zelloberfläche von Endothelzellen. Eine Ko-Färbung von Zellen positiv für den Endothelzellmarker CD31 und eGFP-L10a-positiven Zellen war nicht nachweisbar.

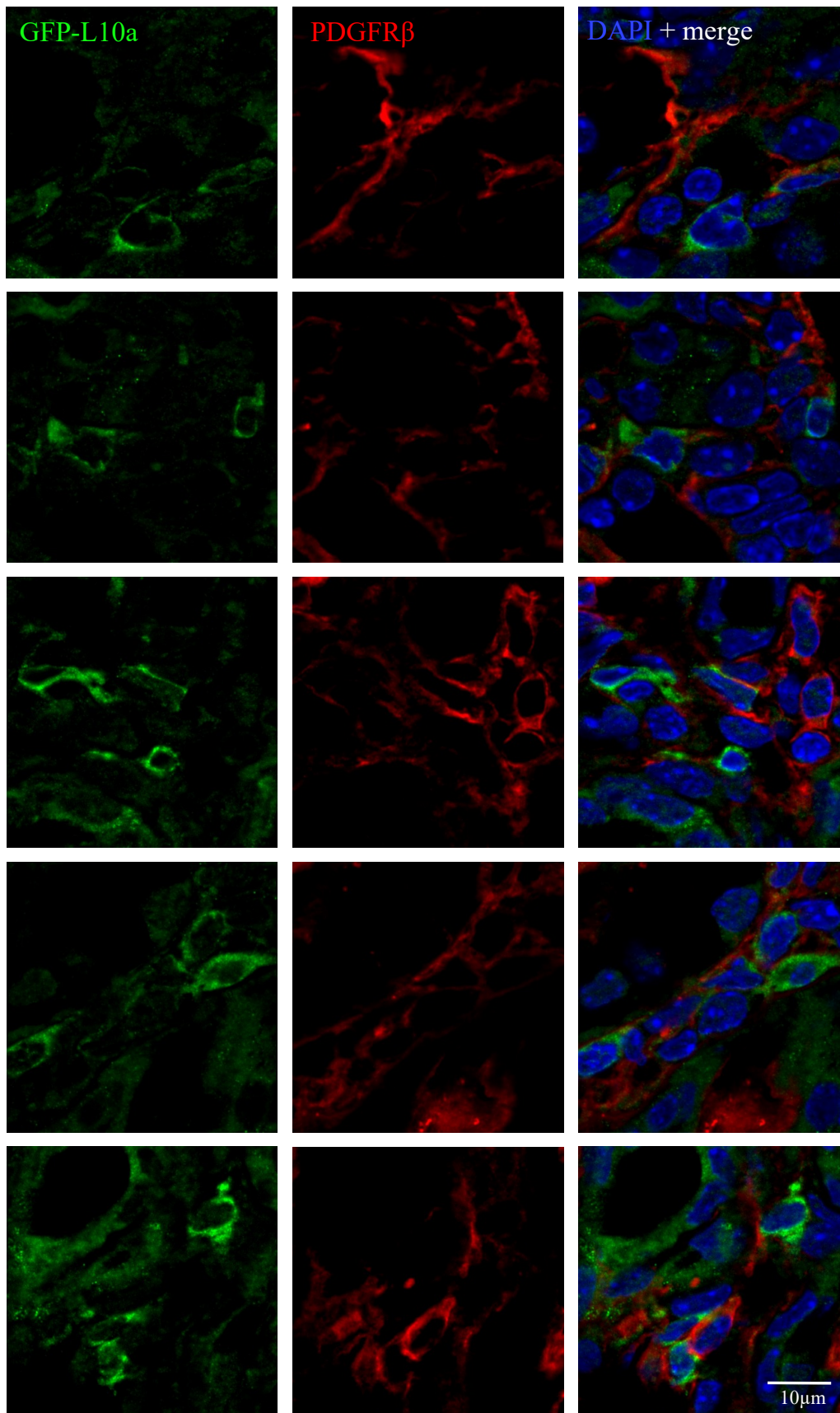


Abbildung 17: EGFP-L10a + PDGFR β -Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe. EGFP-L10a (grün), PDGFR β (rot). EGFP-L10a-positive Zellen sind räumlich teilweise sehr nah mit interstitiellen Fibroblasten (PDGFR β^+) assoziiert, jedoch überwiegend negativ für diesen Marker.

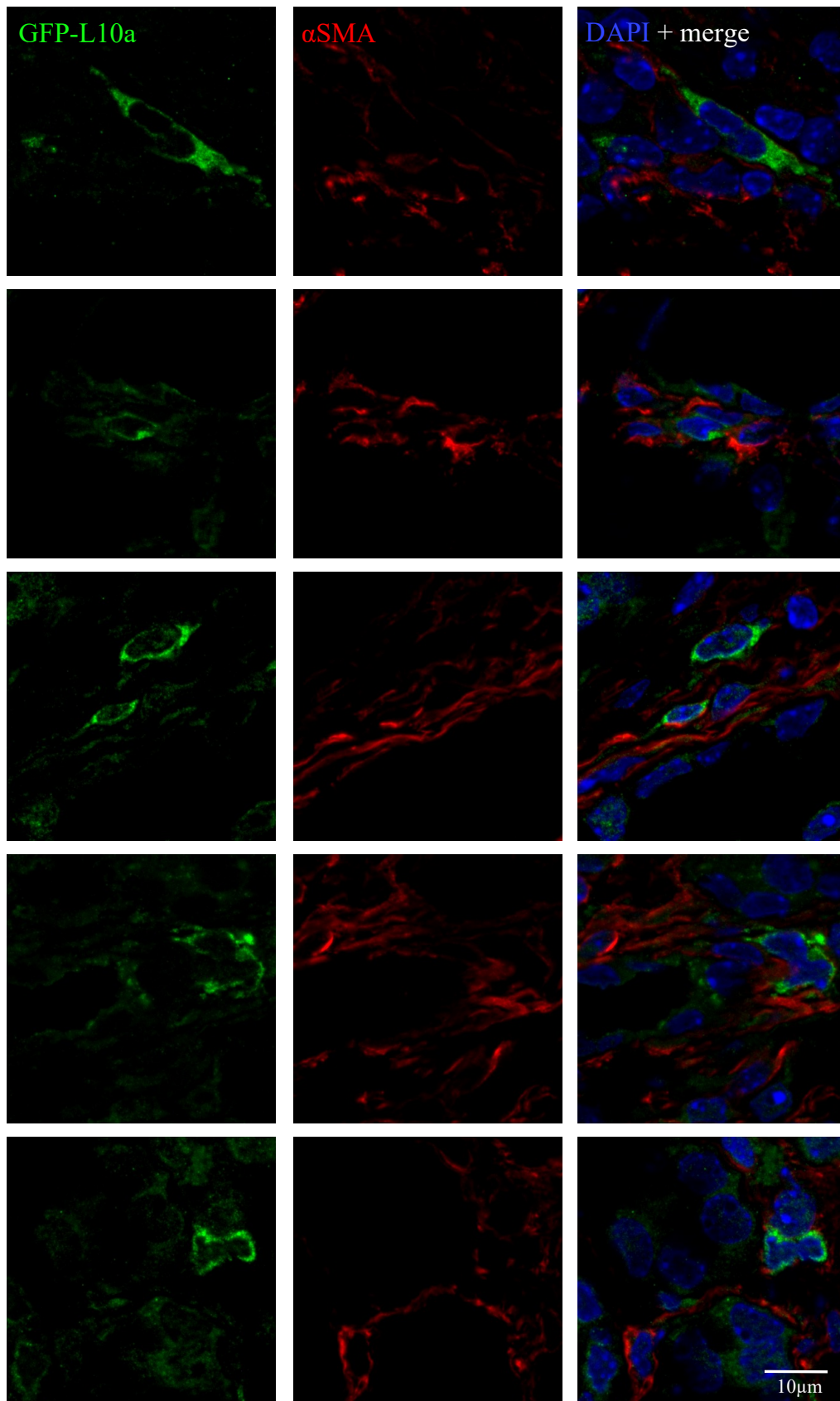


Abbildung 18: EGFP-L10a + α SMA-Immunfluoreszenzfärbungen von Nierengewebe. EGFP-L10a (Grün), α SMA (rot). EGFP-L10a-positive Zellen sind stellenweise räumlich sehr nah mit α SMA-positiven Myofibroblasten im Interstitium assoziiert. Eine relevante Ko-Färbung ist auch hier nicht darstellbar.

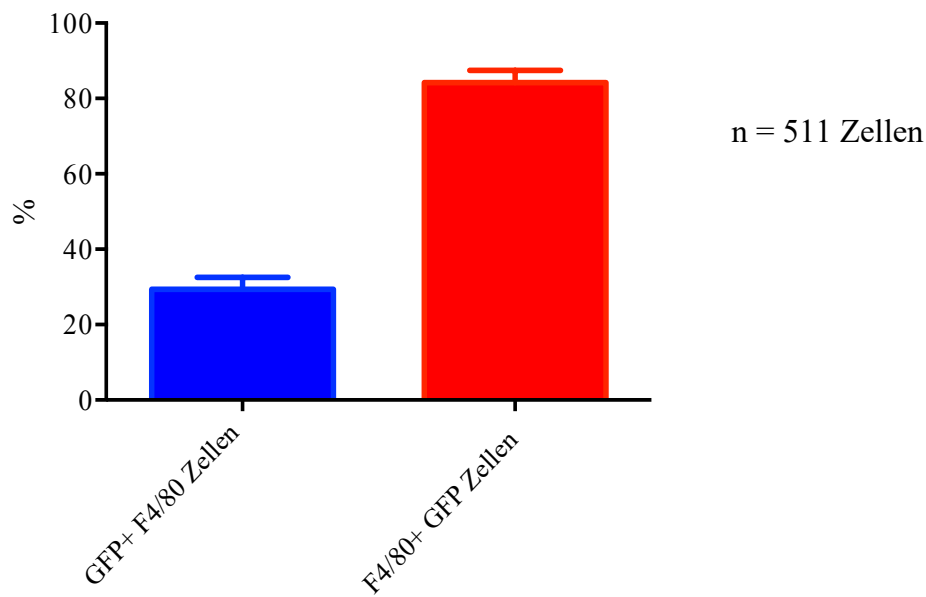


Abbildung 19: Analyse der Bestätigungsfärbung für F4/80. Links: Anteil der gleichzeitig eGFP-L10a-positiven Zellen von allen F4/80-positiven; rechts: Anteil der gleichzeitig F4/80-positiven von allen eGFP-L10a-positiven Zellen. n = 511 Zellen in Nierenschnitten von drei Mac^{TRAP}-Tieren.

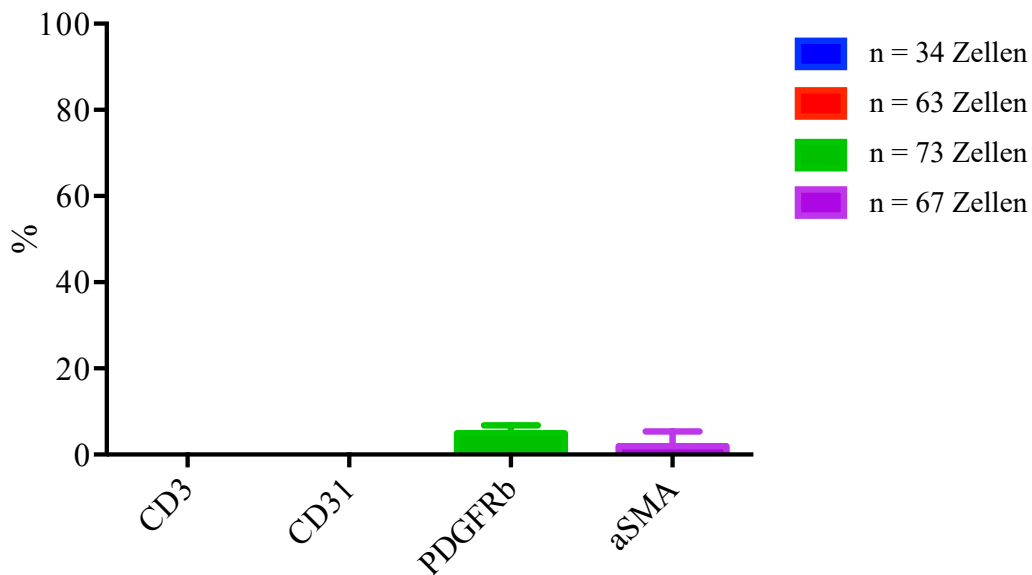


Abbildung 20: Analyse der Ausschlussfärbungen. Gezeigt wird der Anteil eGFP-L10a-positiver Zellen mit gleichzeitiger Positivität für den jeweiligen unten angegebenen zellulären Oberflächenmarker. n = 237 Zellen in Nierenschnitten von drei Mac^{TRAP}-Tieren.

4 Diskussion und Ausblick

Renale Makrophagen spielen wichtige Rollen bei Schädigungs-, Entzündungs- und Fibroseprozessen, aber auch regenerativen Vorgängen der Niere. Sie gelten als komplexe Zellen, die distinkte Phänotypen und funktionelle Charakteristika aufweisen, welche z. T. davon abhängen, welchen Stimuli sie in ihren jeweiligen Mikroumgebungen ausgesetzt sind (Cao et al., 2015).

Dabei sind viele Details noch unerforscht oder unvollständig verstanden, weshalb die TRAP-Methodik eine vielversprechende neue Möglichkeit darstellt, krankheitsrelevante Gene und eventuelle therapeutische Zielstrukturen zelltypspezifisch zu identifizieren und zu definieren, was mit bisherigen Methoden wie z. B. FACS oder Laser capture microdissection (LCM) bisher nur unzureichend und nur mit zahlreichen methodischen Limitationen erreicht werden konnte. Die besondere Stärke der TRAP-Technologie liegt darin, dass sie Untersuchungen vordefinierter, spezifischer Zelltypen auch in kompakten und häufig hochheterogenen Geweben und Organen wie Hirn oder Niere ermöglicht (Heiman et al., 2008). In den Neurowissenschaften konnte der Nutzen des Ansatzes beeindruckend belegt werden. So wurde die Technologie hier beispielsweise für zahlreiche verschiedene ZNS-Zell-Subpopulationen erfolgreich etabliert. (Doyle et al., 2008). Grgic et al. wandten diesen Ansatz im Jahr 2014 erstmals für die Niere zelltypspezifisch für Perizyten und Myofibroblasten erfolgreich an und konnten so zur Definition von Signaturen und Mustern sowie Identifikation neuer Zielgene beitragen.

Die vorliegende Arbeit diene vor allem der schrittweisen Analyse und Validierung einer neu generierten TRAP-Mauslinie (cfms-eGFP-L10a oder Mac^{TRAP}), mit deren Hilfe makrophagenspezifische Genexpressionsprogramme unter anderem in der Niere sowohl im Gesunden als auch bei verschiedenen Erkrankungs- und Regenerationsprozessen gezielt untersucht werden sollen.

4.1 Biometrische Analysen

4.1.1 Wachstumsbeobachtung

Anhand biometrischer Analysen (Wachstums- und Verhaltensbeobachtung, Erfassung von Organgewichten und Vergleich mit dem Wildtyp / der Literatur) sollte zunächst untersucht werden, ob die neu generierte transgene Mac^{TRAP}-Mauslinie möglicherweise phänotypische Auffälligkeiten aufweist.

In longitudinalen Analysen ergaben sich bezüglich Wurfgrößen, körperlicher Entwicklung und Wachstumsprojektionen insgesamt keine groben Unterschiede zwischen transgenen Zuchtpaaren und den Wildtyp-Mäusen. Es wurden Daten zu den beiden einzelnen reinen „Ursprungslinien“ des Jackson Lab zum Vergleich herangezogen. Da die beschriebene Mauslinie zum Zeitpunkt der Untersuchungen einen teils noch gemischten genetischen Hintergrund aus C57BL/6J und DBA/2J hatte, ist die Aussagekraft im direkten Vergleich mit reinen, nicht-transgenen Tieren eingeschränkt. Außerdem stellen die gemessenen 4 Würfe eine recht kleine Stichprobe dar. Zudem wurden die Tiere nicht immer in gleichen Zeitabständen gewogen, welches die spätere Darstellung und Auswertung zum Teil erschwerte. Trotz dieser Limitationen konnte insgesamt konstatiert werden, dass die transgene Mac^{TRAP}-Mauslinie sich durch ein normales Wachstum und Verhalten auszeichnete. Grobe Abnormitäten wurden diesbezüglich nicht beobachtet, auch schien die Fertilität der Tiere unbeeinträchtigt.

4.1.2 Organgrößenvergleich und makroskopische Untersuchung

Es zeigte sich des Weiteren bei Nieren und Milz der Mac^{TRAP}-Tiere ein signifikanter Unterschied der Organgewichte im Vergleich zum Wildtyp. Zu beachten ist hier jedoch angesichts der kleinen Stichprobe die hohe Schwankungsbreite. Außerdem fand die Organentnahme beim Wildtyp in jüngerem Alter statt: Die WT-Tiere waren durchschnittlich 3 Monate alt, wohingegen Mac^{TRAP}-Tiere zum Zeitpunkt der Organentnahme im Durchschnitt ein Alter von 6 Monaten hatten.

Aufgrund dieser Ungenauigkeiten wurde zusätzliche Literatur zum Thema gesucht. Eine wissenschaftliche Publikation, welche Analysen zum gleichen genetischen „mixed background“ anstellt, ließ sich nicht finden, wohl aber eine Arbeit, die die Auswirkung unterschiedlicher Ernährung von Mäusen auf deren Körpergewichte und bestimmte Organgewichte untersucht. Untersucht wurden beide Linien, aus denen sich auch der „mixed background“ von Mac^{TRAP}-Mäusen zusammensetzt: C57BL/6J und DBA/2J (Sohal et al., 2009). Getestet wurden je 20 männliche 6 Monate alte Vertreter der jeweiligen Linie. In Abbildung 21 sind die Organgewichte 6 Monate alter Mac^{TRAP}-Mäuse im Vergleich zu den von Sohal et al. erhobenen Werten gegenübergestellt.

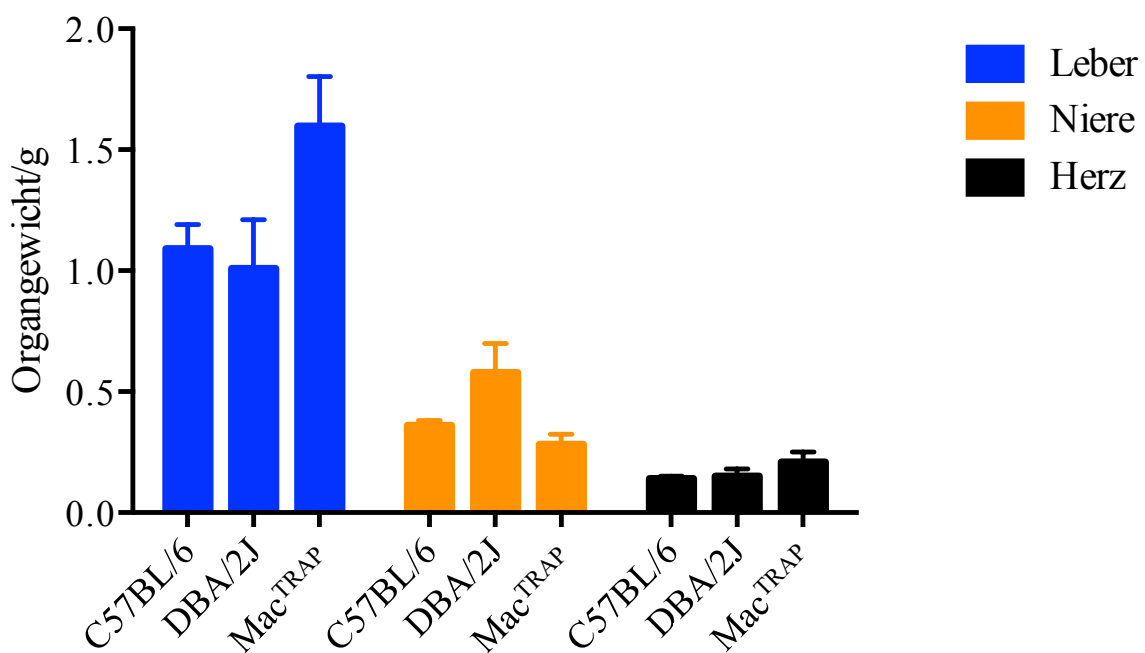


Abbildung 21: Vergleich von Organgewichten aus Sohal et al., 2009 mit selbst erhobenen Daten gleichaltriger Mac^{TRAP}-Tiere. Eine Normierung auf das Körpergewicht fand in der genannten Quelle nicht statt. Für Mac^{TRAP}-Mäuse: n = 20 (je 10 Männchen / Weibchen). Für die anderen Mauslinien je: n = 40 Männchen.

In diesem Vergleich fällt der Gewichtsunterschied der Nieren nur noch minimal aus. Dies legt nahe, dass der Unterschied auf das geringere Alter der WT- Tiere zurückzuführen sein könnte. In Einklang mit dieser Erklärung stehen auch weitere von bei Sohal et al. erhobenen Daten, dass das Nierengewicht im Alter von 23 Monaten weiter zugenommen hatte.

4.2 Molekularbiologische und biochemische Analysen zur Untersuchung der Expression und Induzierbarkeit des cfms-eGFP-L10a-Transgens *in vivo*

Im nächsten Schritt wurde mit molekularbiologischen Methoden die Expression des Transgens *in vivo* überprüft.

Auf mRNA-Niveau konnte eine robuste Expression des Transgens mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Im UUO-Schädigungsmodell, bei dem es zu einer erheblichen Expansion der Makrophagenpopulation in der Niere kommt, konnte eine deutliche Zunahme der eGFP-L10a-Expression nachgewiesen werden. Hieraus konnte eine Induzierbarkeit der Transgenexpression durch proinflammatorische und profibrotische Stimulation geschlussfolgert werden. Dieses Ergebnis werteten wir als qualitatives Merkmal und Ausdruck der Responsivität des Transgens und somit als wichtigen Teil der Validierung der Mac^{TRAP}-Linie.

Als nächstes erfolgte der Nachweis des durch das Transgen kodierten Fusionsproteins eGFP-L10a auf Proteinebene. In Proteinlysaten von ungeschädigtem Nierengewebe von Mac^{TRAP} ließ sich eGFP-L10a per Western Blot nur marginal darstellen. Im Gegensatz dazu waren in Proteinlysaten von UUO-geschädigten fibrosierenden Mac^{TRAP}-Nieren Banden für das eGFP-L10a-Fusionsprotein im Western Blot prompt nachweisbar. Diese Daten weisen ebenfalls auf eine robuste Induktion des Transgens und Hochregulation auch auf Proteinebene nach UUO-Manöver hin. Das Ergebnis steht somit in sehr gutem Einklang mit den Resultaten der molekularbiologischen Analysen.

4.3 Immunhistologie und fluoreszenzmikroskopische Analysen von Mac^{TRAP}-Nierengewebe

Im letzten Schritt sollte durch detaillierte immunhistologische Analysen von Mac^{TRAP}-Nierenschnitten die Identität von eGFP-L10a exprimierenden renalen Zellen untersucht und validiert werden. Hierzu wurden mehrere Ko-Färbungen gegen eGFP-L10a (Proteinprodukt des Transgens), F4/80 (als klassischer Makrophagen-spezifischer Oberflächenmarker) und etablierte Markerproteine anderer interstitieller Zelltypen der Niere durchgeführt.

In den Schnitten der ungeschädigten kontralateralen Nieren konnten insgesamt nur wenige interstitielle Makrophagen durch Immunfluoreszenzfärbung markiert werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen, die auf eine

vergleichsweise niedrige Prävalenz des Fusionsproteins eGFP-L10a in ungeschädigtem Nierengewebe von Mac^{TRAP} hinwies. Des Weiteren war die Epifluoreszenz der ungeschädigten Nierentubuli – und hier insbesondere des proximale Tubulusepithels – sehr ausgeprägt, so dass das visuelle Erkennen und Differenzieren eGFP-L10a-positiver Zellen im intakten Interstitium zusätzlich erschwert wurde. In UUO-Nieren mit deutlich expandierter Makrophagenpopulation und Transgeninduktion zeigte sich dagegen eine bessere Unterscheidbarkeit.

Interessant ist, dass sich lediglich eine partielle Doppelt-Positivität für den allgemeinen Makrophagenmarker F4/80 und das makrophagenspezifische Transgen *c-fms*-eGFP-L10a demonstrieren ließ. Ca. 30 % der F4/80-positiven Zellen zeigten eine klar erkennbar positive Färbung für eGFP-L10a, wohingegen 90 % aller eGFP-L10a-positiven Zellen ebenfalls für F4/80 positiv waren (Abb. 22). Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Eine Erklärung könnte in der bekannten Heterogenität der Makrophagenpopulationen per se liegen, so dass es möglich ist, dass nicht jeder Makrophage zu jedem Zeitpunkt robuste Expressionen von F4/80 und gleichzeitig CSF-1R (auf Basis des *c-fms*-Promotors als Antreiber der Transgenexpression in Mac^{TRAP}) aufweist. Weiterhin könnte ein Teil der eGFP-L10a-positiven Zellen eine Subpopulation von Makrophagen darstellen, die kein F4/80 als Oberflächenmarker tragen (Gordon and Plüddemann, 2013). Ferner kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass in Mac^{TRAP} ein möglicherweise mosaikartiges Expressionsmuster des Transgens in Makrophagen vorliegt. Zudem hat die Immunfluoreszenzhistologie ihre methodischen Limitationen hinsichtlich ihrer Sensitivität, so dass schwache Signale aufgrund eventuell niedriger Expressionsniveaus von Proteinen oder suboptimaler Antikörper-Affinität nicht adäquat detektiert werden können und somit u. U. unerfasst bleiben.

Die wenigen in den Färbungen mit PDGFR β und α SMA gezählten doppelt-positiven Zellen könnten auf die außerordentliche räumliche Nähe der gefärbten Zelltypen zueinander im fibrotischen Interstitium zurückzuführen sein, die bei begrenzten Bildauflösungsmöglichkeiten zuweilen eine klare Zuordnung von Signalen zu einer einzelnen oder möglicherweise zwei eng assoziierten Zellen nicht immer sicher erlauben. Das UUO-geschädigte Interstitium ist höchst zellreich, sodass die vermeintlich positive Färbung auch durch Überlagerung verschiedener Schichten im Mikroskop zustande gekommen sein könnte. Ein eindeutiges Überlappen der gefärbten Abschnitte, wie es bei F4/80 zu sehen war, ließ sich in diesen Färbungen nicht erkennen.

In Zusammenschau der Ergebnisse der immunhistologischen Analysen kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei der Identität der eGFP-L10a-exprimierenden Zellen im Nierengewebe von Mac^{TRAP}-Mäusen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um Makrophagen handelt. Darüber hinaus war das ribosomale Fusionsprotein vor allem in perinukleären Bereichen der Zellen detektierbar, welches der typischen zellulären Lokalisation von ER-assoziierten Ribosomen entspricht.

4.4 Limitationen und Ausblick

Eine mögliche Limitation der neu generierten Mac^{TRAP}-Mauslinie könnte sein, dass der CSF1R (c-fms) auf verschiedenen Makrophagensubpopulationen unterschiedlich stark exprimiert ist (Gordon and Plüddemann, 2013), so dass hier ein gewisser Bias bei der Extraktion der makrozytären polysomalen mRNA denkbar wäre. Um dieser hypothetischen Limitation zu begegnen, könnte es grundsätzlich möglich sein, weitere transgene Mauslinien zu generieren, die andere Makrophagen-Subspezies noch umfassender abdecken, so wie es Doyle et. al. 2008 für multiple Zellpopulationen des Nervensystems realisieren konnten.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten umfangreichen wissenschaftlichen Validierungsexperimente und generierten Analyseergebnisse rechtfertigen die Aussage, dass transgene cfms-eGFP-L10a-/ Mac^{TRAP}-Mäuse das zu erwartende Fusionsprotein eGFP-L10a in relevantem Maße zelltypspezifisch in Makrophagen der Niere exprimieren und eine weitere Induktion als Antwort auf profibrotische Stimulation erreicht werden kann. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass Mac^{TRAP}-Tiere ein vielversprechendes neues Werkzeug für die Erfassung und Analyse von makrophagenspezifischen translationalen Profilen und damit für die detaillierte Erforschung der Biologie von Gewebemakrophagen in vivo darstellen könnten. Auf dieser Basis steht als nächstes die Etablierung des TRAP-Protokolls für verschiedene Organe von Mac^{TRAP}-Mäusen an. Gemäß Abbildung 1 (siehe Einleitung) sollte die gebundene Fraktion der gegen eGFP-L10a gerichteten Immunpräzipitation nun angereicherte polysomale mRNA spezifisch aus Makrophagen enthalten. In nachfolgend durchgeführten ersten TRAP-Ansätzen mit Mac^{TRAP}-Tieren einschließlich sukzessiver RNA-Sequenzierung und bioinformatischer Analyse konnten bereits wertvolle Daten generiert und Signaturen von renalen Gewebemakrophagen definiert werden (Hofmeister et al., 2020).

Auf dieser Grundlage könnte in künftigen Projekten Mac^{TRAP} nunmehr in verschiedenen Schädigungsmodellen angewendet und die Genexpressionsdynamiken von Makrophagen beispielsweise in verschiedenen Phasen der renalen Fibrogenese studiert werden. Dies könnte dazu beitragen, neue Biomarker für das Krankheitsgeschehen zu entdecken, neuartige therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren und möglicherweise effektivere Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Ferner ist darauf hinzuweisen, dass die cfms-eGFP-L10a-Transgenexpression nicht ausschließlich auf Makrophagen der Niere beschränkt ist, sondern auch in Gewebsmakrophagen anderer Organe vorliegt (Gordon et al., 2014), sodass die Mac^{TRAP}-Maus auch für die Untersuchung der Makrophagenbiologie pathologischer Prozesse in anderen Organsystemen nützlich sein sollte.

5 Zusammenfassung

Gewebsmakrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Organ-Homöostase, der Immunität und der Pathogenese verschiedener durch inflammatorische Prozesse angetriebener Erkrankungen. Eine besondere Herausforderung ist dabei die selektive Untersuchung residenter Makrophagen in hoch heterogenen Organen wie der Niere.

Um dieses Problem zu adressieren, wurde kürzlich der Ansatz der TRAP (Translational Ribosome Affinity Purification) etabliert und eine neuartige makrophagenspezifische TRAP-Mauslinie generiert. Bei diesen transgenen Mäusen (c-fms-eGFP-L10a, Mac^{TRAP}) wird ein eGFP-markiertes ribosomales Protein (L10a) unter der Kontrolle des makrophagenspezifischen Promotors c-fms exprimiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine wissenschaftliche Charakterisierung und umfangreiche Validierung dieser neu geschaffenen TRAP-Mauslinie unter Verwendung biometrischer, molekularbiologischer, biochemischer und immunhistologischer Methoden.

Zunächst zeigte sich, dass keine groben Auffälligkeiten in der Entwicklung, dem Verhalten und der Fortpflanzung von Mac^{TRAP} vorlagen.

Im nächsten Schritt wurde die Transgenexpression untersucht und konnte mittels RT-PCR und Western Blot im Nierengewebe erfolgreich nachgewiesen werden. Immunhistologische Analysen von Nierenschnitten aus Mac^{TRAP}-Mäusen konnten eGFP-L10a exprimierende Zellen im tubulointerstitiellen Kompartiment identifizieren, welche ebenfalls positiv für den Makrophagen-Oberflächenmarker F4/80 waren. Im Gegensatz dazu wurde keine signifikante Kofärbung mit klassischen Markern anderer im Tubulointerstitium lokalisierter Zellen wie CD31 (Endothelzellen), PDGFR β (Perizyten, perivaskuläre Fibroblasten), α SMA (Myofibroblasten, VSMC) oder CD3 (Lymphozyten) festgestellt. Proinflammatorische und gleichzeitig fibroseinduzierende Stimulation durch unilaterale ureterale Obstruktion (UUO-Manöver) führte zu einer signifikanten eGFP-L10a-Hochregulation in fibrotischen UUO-Nieren, welches auf eine adäquate Responsivität des Modells *in vivo* hinweist und so die Nutzbarkeit einer potenziellen Anwendung von Mac^{TRAP} in experimentellen Pathomodellen untermauert und rechtfertigen würde.

Aufbauend auf diesen vielversprechenden Validierungsergebnissen soll Mac^{TRAP} in Folgeprojekten für die Extraktion von makrophagenspezifischer polysomaler mRNA aus Nierengewebe und nachgeschalteter RNA-Sequenzierung mit bioinformatischer Analytik genutzt werden. Dieser innovative Ansatz soll dazu beitragen, die bisher unzureichend

verstandenen *in vivo* Genexpressionsdynamiken und Signalwegssignaturen residenter renaler Makrophagen umfassend zu definieren. Zusammenfassend liefert diese neue Mauslinie ein neues Werkzeug zum besseren Verständnis der renalen Makrophagenbiologie während Homöostase sowie in verschiedenen entzündungsgetriebenen Krankheitsmodellen der Niere einschließlich der Nierenfibrose. Vor dem Hintergrund der universellen Anwendbarkeit von Mac^{TRAP} sind darüber hinaus auch Applikationen für die Untersuchung von Gewebsmakrophagen in anderen Organen in einer Reihe weiterer Pathomodelle in der Zukunft denkbar.

6 Summary

Tissue macrophages play critical roles in organ homeostasis, immunity, and the pathogenesis of various inflammatory-driven diseases. A particular challenge is the selective investigation of resident macrophages in highly heterogeneous organs such as the kidney. To address this problem, the TRAP (Translational Ribosome Affinity Purification) approach was recently established, and a novel macrophage-specific TRAP mouse line was generated. In these transgenic mice (c-fms-eGFP-L10a, Mac^{TRAP}), an eGFP-tagged ribosomal protein (L10a) is expressed under the control of the macrophage-specific promoter c-fms. The aim of the dissertation was a first scientific characterization and comprehensive validation of this recently created TRAP mouse line using biometric, molecular biological, biochemical and immunohistological methods.

First, observational and biometric studies found no gross abnormalities in the development, behavior and reproduction of Mac^{TRAP}. In the next step, transgene expression was examined and successfully detected in the kidney tissue using RT-PCR and Western blotting. Immunohistological analyses of kidney sections from Mac^{TRAP} mice clearly identified eGFP-L10a expressing cells in the tubulointerstitial compartment, which were predominantly also positive for the macrophage surface marker F4/80. By contrast, no significant co-staining was detected with classical markers of other cell types located in the tubulointerstitium, such as CD31 (endothelial cells), PDGFR β (pericytes, perivascular fibroblasts), α SMA (myofibroblasts, VSMC) and CD3 (lymphocytes). Proinflammatory and fibrosis-inducing stimulation by unilateral ureteral obstruction (UUO maneuver) resulted in significant eGFP-L10a upregulation in fibrotic UUO

kidneys, indicating adequate responsiveness of the model *in vivo* and thus illustrating and corroborating the usefulness of a potential application of Mac^{TRAP} in experimental disease models. Based on these promising validation results, Mac^{TRAP} could well be used in follow-up projects for the extraction of macrophage-specific, polysomal mRNA from kidney tissue and subsequent RNA sequencing combined with bioinformatic analyses. This innovative approach may contribute to the definition of the hitherto poorly understood *in vivo* gene expression dynamics and signaling pathway signatures of resident renal macrophages. In summary, this new mouse line provides a new tool to help better understand renal macrophage biology during homeostasis and in various inflammation-driven disease models of the kidney including renal fibrosis. Given the universal applicability, Mac^{TRAP} may also be used for the investigation of tissue macrophages in various other organs and different disease models in the future.

7 Literaturverzeichnis

1. **Battegay, E.**, 2012. Siegenthalers Differenzialdiagnose: innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose. Thieme.
2. **Bertram, J.F.**, Douglas-Denton, R.N., Diouf, B., Hughson, M.D., Hoy, W.E., 2011. Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 26, 1529–1533. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1843-8>
3. **Brunskill, E.W.**, Georgas, K., Rumballe, B., Little, M.H., Potter, S.S., 2011. Defining the molecular character of the developing and adult kidney podocyte. *PLoS One* 6, e24640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024640>
4. **Campanholle, G.**, Ligresti, G., Gharib, S.A., Duffield, J.S., 2013. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304, C591-603. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00414.2012>
5. **Cao, Q.**, Harris, D.C.H., Wang, Y., 2015. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiol. Bethesda Md* 30, 183–194. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2014>
6. **Castañó, A.P.**, Lin, S.-L., Surowy, T., Nowlin, B.T., Turlapati, S.A., Patel, T., Singh, A., Li, S., Lupher, M.L., Duffield, J.S., 2009. Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Sci. Transl. Med.* 1, 5ra13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000111>
7. **Chalmers, S.A.**, Chitu, V., Herlitz, L.C., Sahu, R., Stanley, E.R., Putterman, C., 2015. Macrophage depletion ameliorates nephritis induced by pathogenic antibodies. *J. Autoimmun.* 57, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.11.007>
8. **Clements, M.**, Gershenovich, M., Chaber, C., Campos-Rivera, J., Du, P., Zhang, M., Ledbetter, S., Zuk, A., 2016. Differential Ly6C Expression after Renal Ischemia-Reperfusion Identifies Unique Macrophage Populations. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 159–170. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111138>
9. **Coca, S.G.**, Singanamala, S., Parikh, C.R., 2012. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int.* 81, 442–448. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.379>
10. **Doyle, J.P.**, Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., Gong, S., Greengard, P., Heintz, N., 2008. Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135, 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.>

- 10.029
11. **Duffield, J.S.**, 2010. Macrophages and Kidney Disease: Macrophages and Immunological Inflammation of the kidney. *Semin. Nephrol.* 30, 234–254. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.03.003>
 12. **Duffield, J.S.**, 2003. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 104, 27–38. <https://doi.org/10.1042/>
 13. **Duffield, J.S.**, Forbes, S.J., Constandinou, C.M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R., Iredale, J.P., 2005a. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.* 115, 56–65. <https://doi.org/10.1172/JCI22675>
 14. **Duffield, J.S.**, Tipping, P.G., Kipari, T., Cailhier, J.-F., Clay, S., Lang, R., Bonventre, J.V., Hughes, J., 2005b. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 167, 1207–1219. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61209-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61209-6)
 15. **Emmert-Buck, M.R.**, Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., Liotta, L.A., 1996. Laser capture microdissection. *Science* 274, 998–1001. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.998>
 16. **Ferenbach, D.A.**, Sheldrake, T.A., Dhaliwal, K., Kipari, T.M.J., Marson, L.P., Kluth, D.C., Hughes, J., 2012. Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney Int.* 82, 928–933. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.207>
 17. **Frangogiannis, N.G.**, Dewald, O., Xia, Y., Ren, G., Haudek, S., Leucker, T., Kraemer, D., Taffet, G., Rollins, B.J., Entman, M.L., 2007. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 115, 584–592. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646091>
 18. **Friedman, S.L.**, Sheppard, D., Duffield, J.S., Violette, S., 2013. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci. Transl. Med.* 5, 167sr1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004700>
 19. **Gordon, S.**, Plüddemann, A., 2013. Tissue macrophage heterogeneity: issues and prospects. *Semin. Immunopathol.* 35, 533–540. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0386-4>
 20. **Gordon, S.**, Plüddemann, A., Martinez Estrada, F., 2014. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* 262, 36–55.

- <https://doi.org/10.1111/imr.12223>
21. **Grgic, I.**, Duffield, J.S., Humphreys, B.D., 2012. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 27, 183–193. <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1772-6>
 22. **Grgic, I.**, Hofmeister, A.F., Genovese, G., Bernhardt, A.J., Sun, H., Maarouf, O.H., Bijol, V., Pollak, M.R., Humphreys, B.D., 2014a. Discovery of new glomerular disease-relevant genes by translational profiling of podocytes in vivo. *Kidney Int.* 86, 1116–1129. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.204>
 23. **Grgic, I.**, Krautzberger, A.M., Hofmeister, A., Lalli, M., DiRocco, D.P., Fleig, S.V., Liu, J., Duffield, J.S., McMahon, A.P., Aronow, B., Humphreys, B.D., 2014b. Translational profiles of medullary myofibroblasts during kidney fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25, 1979–1990. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101143>
 24. **Han, Y.**, Ma, F.Y., Tesch, G.H., Manthey, C.L., Nikolic-Paterson, D.J., 2011. c-fms blockade reverses glomerular macrophage infiltration and halts development of crescentic anti-GBM glomerulonephritis in the rat. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 91, 978–991. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.61>
 25. **Harrison, T.R.**, Longo, D.L. (Eds.), 2012. *Harrison's principles of internal medicine*, 18th ed.
 26. **Heiman, M.**, Schaefer, A., Gong, S., Peterson, J.D., Day, M., Ramsey, K.E., Suárez-Fariñas, M., Schwarz, C., Stephan, D.A., Surmeier, D.J., Greengard, P., Heintz, N., 2008. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.028>
 27. **Henderson, N.C.**, Mackinnon, A.C., Farnworth, S.L., Kipari, T., Haslett, C., Iredale, J.P., Liu, F.-T., Hughes, J., Sethi, T., 2008. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am. J. Pathol.* 172, 288–298. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070726>
 28. **Hofmeister, A.**, Thomaßen, M.C., Markert, S., Marquardt, A., Preußner, M., Rußwurm, M., Schermuly, R.T., Steinhoff, U., Gröne, H.-J., Hoyer, J., Humphreys, B.D., Grgic, I., 2020. Development of a new macrophage-specific TRAP mouse (MacTRAP) and definition of the renal macrophage translational signature. *Sci. Rep.* 10, 7519. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63514-6>
 29. **Hu, P.**, Zhang, W., Xin, H., Deng, G., 2016. Single Cell Isolation and Analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00116>
 30. **Huen, S.C.**, Cantley, L.G., 2015. Macrophage-mediated injury and repair after

- ischemic kidney injury. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 30, 199–209. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2726-y>
31. **Huen, S.C.**, Moeckel, G.W., Cantley, L.G., 2013. Macrophage-specific deletion of transforming growth factor- β 1 does not prevent renal fibrosis after severe ischemia-reperfusion or obstructive injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 305, F477–484. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00624.2012>
32. **Ingolia, N.T.**, Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., Weissman, J.S., 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218–223. <https://doi.org/10.1126/science.1168978>
33. **Kang, S.S.**, Baker, K.E., Wang, X., Kocher, J.-P., Fryer, J.D., 2017. Translational profiling of microglia reveals artifacts of cell sorting (preprint). *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/135566>
34. **Koolman, J.**, Röhm, K.-H., 2003. *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag.
35. **Lange-Sperandio, B.**, Cachat, F., Thornhill, B.A., Chevalier, R.L., 2002. Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice. *Kidney Int.* 61, 516–524. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00162.x>
36. **LeBleu, V.S.**, Taduri, G., O’Connell, J., Teng, Y., Cooke, V.G., Woda, C., Sugimoto, H., Kalluri, R., 2013. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat. Med.* 19, 1047–1053. <https://doi.org/10.1038/nm.3218>
37. **Lee, S.**, Huen, S., Nishio, H., Nishio, S., Lee, H.K., Choi, B.-S., Ruhrberg, C., Cantley, L.G., 2011. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 317–326. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009060615>
38. **Lichtnekert, J.**, Kawakami, T., Parks, W.C., Duffield, J.S., 2013. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.05.013>
39. **Lin, S.L.**, Castaño, A.P., Nowlin, B.T., Lupher, M.L., Duffield, J.S., 2009. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 6733–6743. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901473>
40. **Lin, S.-L.**, Li, B., Rao, S., Yeo, E.-J., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Pei, H., Chen, L., Zheng, J.J., Carroll, T.J., Pollard, J.W., McMahon, A.P., Lang, R.A., Duffield, J.S., 2010. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A. 107, 4194–4199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912228107>
41. **Longmore, M.**, Wilkinson, I., Baldwin, A., Wallin, E., 2014. Oxford Handbook of Clinical Medicine. OUP Oxford.
 42. **MacDonald, K.P.A.**, Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C., Kuns, R., Pettit, A.R., Clouston, A., Wainwright, B., Branstetter, D., Smith, J., Paxton, R.J., Cerretti, D.P., Bonham, L., Hill, G.R., Hume, D.A., 2010. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* 116, 3955–3963. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266296>
 43. **Martinez, F.O.**, Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
 44. **Nishida, M.**, Okumura, Y., Fujimoto, S.-I., Shiraishi, I., Itoi, T., Hamaoka, K., 2005. Adoptive transfer of macrophages ameliorates renal fibrosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.083>
 45. **Nishida, M.**, Okumura, Y., Ozawa, S.-I., Shiraishi, I., Itoi, T., Hamaoka, K., 2007. MMP-2 inhibition reduces renal macrophage infiltration with increased fibrosis in UUO. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.165>
 46. **Rassow, J.**, Hauser, K., Deutzmann, R., Netzker, R., 2016. *Duale Reihe Biochemie*, 4th ed.
 47. **Ricardo, S.D.**, van Goor, H., Eddy, A.A., 2008. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J. Clin. Invest.* 118, 3522–3530. <https://doi.org/10.1172/JCI36150>
 48. **Rosin, D.L.**, Okusa, M.D., 2011. Dangers Within: DAMP Responses to Damage and Cell Death in Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 416–425. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010040430>
 49. **Sasmono, R.T.**, Oceandy, D., Pollard, J.W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B.J., Ostrowski, M.C., Himes, S.R., Hume, D.A., 2003. A macrophage colony-stimulating factor receptor–green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* 101, 1155–1163. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0569>
 50. **Sauter, K.A.**, Pridans, C., Sehgal, A., Tsai, Y.T., Bradford, B.M., Raza, S., Moffat, L., Gow, D.J., Beard, P.M., Mabbott, N.A., Smith, L.B., Hume, D.A., 2014.

- Pleiotropic effects of extended blockade of CSF1R signaling in adult mice. *J. Leukoc. Biol.* 96, 265–274. <https://doi.org/10.1189/jlb.2A0114-006R>
51. **Short, K.M.**, Combes, A.N., Lefevre, J., Ju, A.L., Georgas, K.M., Lamberton, T., Cairncross, O., Rumballe, B.A., McMahon, A.P., Hamilton, N.A., Smyth, I.M., Little, M.H., 2014. Global quantification of tissue dynamics in the developing mouse kidney. *Dev. Cell* 29, 188–202. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.02.017>
52. **Sica, A.**, Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
53. **Sohal, R.S.**, Ferguson, M., Sohal, B.H., Forster, M.J., 2009. Life span extension in mice by food restriction depends on an energy imbalance. *J. Nutr.* 139, 533–539. <https://doi.org/10.3945/jn.108.100313>
54. **Strutz, F.**, Neilson, E.G., 2003. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin. Immunopathol.* 24, 459–476. <https://doi.org/10.1007/s00281-003-0123-5>
55. **Takemoto, M.**, Asker, N., Gerhardt, H., Lundkvist, A., Johansson, B.R., Saito, Y., Betsholtz, C., 2002. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am. J. Pathol.* 161, 799–805. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64239-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64239-3)
56. **Walker, K.A.**, Cai, X., Caruana, G., Thomas, M.C., Bertram, J.F., Kett, M.M., 2012. High nephron endowment protects against salt-induced hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303, F253–258. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00028.2012>
57. **Weidtmann, B.**, Schunkert, P.D.H., 2007. Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen. *Internist* 48, 770–778. <https://doi.org/10.1007/s00108-007-1901-2>
58. **Welsch, U.**, Sobotta, J. (Eds.), 2006. *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen, 2., völlig überarb. Aufl. ed.*
59. **Wynn, T.A.**, Barron, L., 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 30, 245–257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>
60. **Zeisberg, E.M.**, Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., Neilson, E.G., Sayegh, M.H., Izumo, S., Kalluri, R., 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 13, 952–961. <https://doi.org/10.1038/nm1613>
61. **Zhang, M.-Z.**, Yao, B., Yang, S., Jiang, L., Wang, S., Fan, X., Yin, H., Wong, K., Miyazawa, T., Chen, J., Chang, I., Singh, A., Harris, R.C., 2012. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J. Clin. Invest.* 122, 4519–4532.

<https://doi.org/10.1172/JCI60363>

62. **Zhenilo, S.**, Khrameeva, E., Tsygankova, S., Zhigalova, N., Mazur, A., Prokhortchouk, E., 2015. Individual genome sequencing identified a novel enhancer element in exon 7 of the CSFR1 gene by shift of expressed allele ratios. *Gene* 566, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.053>
63. **Zuk, A.**, Bonventre, J.V., 2016. Acute Kidney Injury. *Annu. Rev. Med.* 67, 293–307. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050214-013407>

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren folgende Damen und Herren an der **Philipps-Universität Marburg**:

Alter, Bartsch, Bauer, Becker A, Becker K, Becker S, Best, Bien, Bonaterra, Brehm, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Fendrich, Feuser, Fisseni, Fritz, Görg, Gress, Grgic, Grundmann, Haas, Halaszovich, Hertl, Hildebrandt, Hoch, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kinscherf, Klose, Knorrenschild, Koolmann, Köhler, König, Koczulla, Kortus-Götze, Kühnert, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maier-Giebing, Maisch, Meißner, Milani, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Patrascan, Peterlein, Pfestroff, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Rinne, Rosenow, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Sohlbach, Schäfer J, Schäfer M, Schieffer, Schoner, Schratt, Schu, Schulze, Schütz, Schwabe, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Stahl, Steiniger, Stief, Strik, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Thum, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wiesmann, Worzfeld, Wulf, Zavorotnyy

8.2 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, welche mich über Jahre hinweg in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und mir damit überhaupt erst das Studium und die Promotion ermöglicht haben. Insbesondere meiner Mutter Doris Thomaßen, welche über die letzten Jahre nicht müde geworden ist, mich mit dem nötigen Nachdruck zur Vollendung dieser Arbeit zu bringen, habe ich viel zu verdanken. Aber nicht nur in Bezug auf diese Arbeit, sondern auch im Hinblick auf meine persönliche Entwicklung und berufliche Orientierung ist sie immer mein größtes Vorbild gewesen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ivica Grgic habe ich zu verdanken, meinen Weg in die Nephrologie gefunden zu haben, nachdem wir uns im Jahr 2012 erstmalig in der Notaufnahme über den Weg gelaufen sind. Über seinen Kontakt kam ich zum nephrologischen Labor und in die nephrologische Klinik, und ohne ihn wäre meine bisherige berufliche Laufbahn sicherlich völlig anders verlaufen. Ich danke ihm von Herzen für die vielen wertvollen Diskussionen, grenzenlose Geduld und Unterstützung. Außerdem danke ich meinen Kollegen im Labor, Dr. Andreas Hofmeister, Sabrina Markert und Dr. Sybelle Goedicke-Fritz für die tagtägliche Unterstützung und ständigen Rat beim Erlernen und Durchführen der Methoden und Experimente.

Meinen Freunden, meiner Wahlfamilie (F!) und meiner Partnerin Fabienne Scharf danke ich schließlich für die nötige Work-Life-Balance, die mich zwischen Beruf, Forschung und sonstigen Verpflichtungen nicht den Verstand verlieren ließ.